NEUROPHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DER SÄUGERRETINA

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Jürgen Bolz
aus Urach

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

NEUROPHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DER SÄUGERRETINA

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Jürgen Bolz
aus Urach

1983

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 1983

Dekan: Professor Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wässle
2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Varjú

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
0.	Vorbemerkung	6
1.	Allgemeine Einführung	10
2.	Histologische Untersuchungen	13
2.1	Einleitung	13
2.2	Methodik	15
2.2.1	Antiserum	15
2.2.2	Präparation	15
2.2.3	Immunohistochemie	16
2.2.4	Cytochrom Oxidase Histochemie	17
2.2.5	Auswertung von retinalen Totalpräparaten	18
2.2.6	Autoradiographie	19
2.3	Ergebnisse	20
2.3.1	AAT Immunohistochemie	20
2.3.2	GAD Immunohistochemie	24
2.3.3	Cytochrom Oxidase Aktivität	26
2.3.4	Glycin akkumulierende Zellen	29
2.4	Diskussion	31
2.4.1	AAT Immunohistochemie: Aktivitätsmarker oder Marker für Transmitterfunktion?	31
2.4.2	Lokalisation von Glycin in der Retina	34

		Seite
3.	Physiologische Untersuchungen	36
3.1	Einleitung	36
3.2	Methodik	39
3.2.1	Präparation	39
3.2.2	Ganglienzellklassifikation	40
3.2.3	Optische Stimulation und Datenauswertung	41
3.2.4	Iontophorese in der Retina	42
3.3	Ergebnisse	48
3.3.1	Wirkung von APB auf ON-Zentrums Zellen	48
3.3.2	Wirkung von APB auf OFF-Zentrums Zellen	51
3.3.3	Wirkung von APB auf die Umfeld-Antwort	54
3.3.4	Die umgekehrte APB Antwort	56
3.3.5	Wirkung von Glycin auf die Zentrumsantwort	60
3.3.6	Wirkung von Glycin auf die Umfeldantwort	66
3.4	Diskussion	71
3.4.1	Die umgekehrte APB Antwort	71
3.4.2	Blockiert APB die ON-Antwort in der Retina?	74
3.4.3	Implikationen für den Mechanismus der Umfeldantwort	77
3.4.4	Glycinerge Inhibition in der Retina	79

		Seite
4.	Neuropeptide	82
4.1	Einleitung	82
4.2	Methodik	84
4.3	Ergebnisse	85
4.3.1	Wirkung von TRH auf ON- und OFF-Zellen	85
4.3.2	Wirkung von TRH bei skotopischer und photopischer Beleuchtung	87
4.3.3	Vergleich der Serotonin- und TRH-Antwort	90
4.4	Diskussion	94
5.	Literatur	96
6.	Danksagung	109

0. Vorbemerkung

Während meiner Tätigkeit am Friedrich-Miescher Laboratorium der Max-Planck Gesellschaft in Tübingen und am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt sowie an der University of California in Los Angeles sind die unten aufgeführten Arbeiten veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht worden. Leider sind diese Arbeiten vom Fachbereich Biologie der Universität Tübingen nicht als Dissertation anerkannt worden und deshalb wurde die hier vorliegende deutsche Fassung geschrieben, die einige Aspekte der Veröffentlichungen zusammenfaßt. Der interessierte Leser sei aber auf die Originalarbeiten verwiesen.

Veröffentlichungen

Jürgen Bolz und Heinz Wässle: Glycinergic inhibition in the cat retina. Proc. Roy. Soc. Lond. B. (eingereicht).

Jürgen Bolz und Heinz Wässle: Action and localization of GABA in the cat retina. J. Physiol. (eingereicht).

Jürgen Bolz und Leo Peichl: Neurotoxic effects of kainic acid in the cat retina (in Vorbereitung)

Jürgen Bolz und Peter Thier: Photopic action of a neuropeptide in the cat retina. (in Vorbereitung).

Jürgen Bolz, Gerd Rosner und Heinz Wässle: Response latency of brisk-sustained(X) and brisk-transient(Y) cells in the cat retina. J. Physiol. 328, 171-190, 1982.

Jürgen Bolz, Peter Thier und Nicholas Brecha: Localization of AAT and cytochrome oxidase in cone pedicles and ganglion cells in the cat retina. J. Neurocyt. (eingereicht).

Jürgen Bolz, Heinz Wässle und Peter Thier: Pharmacological modulation of ON- and OFF-centre ganglion cells in the cat retina. Neuroscience. (im Druck).

Leo Peichl und Jürgen Bolz: Kainic acid induces sprouting of retinal neurons. Science (im Druck).

Peter Thier und Jürgen Bolz: CCK in the cat retina (in Vorbereitung).

Peter Thier, Thomas Voigt und Jürgen Bolz: Does taurine subserve a function in neuronal processing in the cat retina? Proc. Roy. Soc. Lond. B. (eingereicht).

Kurzmitteilungen

1981: Jürgen Bolz, Gerd Rosner und Heinz Wässle: Einige Methoden zur Messung zeitlicher Übertragungseigenschaften retinaler Ganglienzellen der Katze.
Deutsche Neurobiologentagung, Göttingen

Gerd Rosner und Jürgen Bolz: Einfluß von Neurotransmittern auf das Antwortverhalten retinaler Ganglienzellen der Katze.
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1981, 264

1982: Jürgen Bolz und Heinz Wässle: Neuropharmakologische Untersuchungen zur Adaptation in der Katzenretina.
Deutsche Neurobiologentagung, Göttingen

Leo Peichl und Jürgen Bolz: Neurotoxische Effekte von Kainic Acid in der Säugerretina.
Deutsche Neurobiologentagung, Göttingen

1983: Jürgen Bolz und Nicholas Brecha: Immunohistochemische und autoradiographische Untersuchungen an der Katzenretina.
Deutsche Neurobiologentagung, Göttingen.

Jürgen Bolz und Heinz Wässle: The action of inhibitory amino acids and their antagonists on cat retinal ganglion cells.
Neuroscience Lett. Suppl. 14, S. 35

Leo Peichl und Jürgen Bolz: Retinale Ganglienzellantworten nach pharmakologischer Zerstörung präsynaptischer Neurone. Deutsche Neurobiologentagung, Göttingen

Leo Peichl und Jürgen Bolz: Sprouting in the retina after Kainic acid treatment.
Neuroscience Lett. Suppl. 14, S. 277.

Peter Thier, Jürgen Bolz und Nicholas Brecha: Metabolic activity and transmitter function of aspartate/glutamate in the cat retina.
Neuroscience Lett. Suppl. 14, S. 372.

1. Allgemeine Einführung

Neurone kommunizieren untereinander mit chemischen Überträgerstoffen. Es sind zahlreiche verschiedene Neurotransmitter im Nervensystem bekannt und bei einer noch größeren Zahl von Substanzen wird eine Neurotransmitterfunktion vermutet. In den letzten Jahren wurden nun neuropharmakologische Methoden entwickelt, mit denen versucht wird, aufgrund der chemischen Diversität von Neuronen Aussagen über Struktur-Funktionsbeziehungen im Nervensystem zu machen.

Bei strukturellen Untersuchungen werden Neurone, die einen bestimmten Transmitter benutzen, selektiv markiert. Neben klassischen histochemischen Verfahren werden hierzu hauptsächlich immunohistochemische Techniken angewandt, bei denen Transmittersubstanzen bzw. Schlüsselenzyme im Transmittermetabolismus mit Antikörpern lokalisiert werden. Bei einem anderen Verfahren benutzt man zur Markierung die Tatsache, daß Neurone die Aminosäuren, Catecholamine oder Indolamine als Transmitter verwenden ein spezifisches, hochaffines Aufnahmesystem für den jeweiligen Transmitter besitzen. Nach Inkubation mit radioaktiv markierten Transmittern oder nicht metabolisierbaren Analoga können dann mit autoradiographischen Methoden die Neurone identifiziert werden, die den jeweiligen Transmitter benutzen. Im Gegensatz zu manchen klassischen anatomischen Methoden, wie etwa der Golgi-Technik, erlauben transmitterspezifische Markierungsverfahren quantitative Aussagen über Neuronenpopulationen.

Bei funktionellen Studien wird die Wirkung von Neurotransmittern oder Transmitterantagonisten auf die elektrophysiologisch gemessene Zellantwort untersucht. Der Einfluß präsynaptischer Neurone, die einen bestimmten Transmitter benutzen, wird durch die Applikation von Agonisten imitiert bzw. durch Antagonisten blockiert, um so deren Beitrag zur postsynaptischen Zellantwort zu bestimmen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden an der Retina der Katze durchgeführt. Die Retina ist ontogenetisch eine Ausstülpung des Dienzephalons und damit ein Teil des zentralen Nervensystems. Praktisch alle Neurotransmitter und Transmitterkandidaten, die in verschiedenen Hirnarealen beschrieben wurden, sind auch in der Retina gefunden worden. Die Retina eignet sich also für die oben skizzierte neuropharmakologische Analyse und bietet gegenüber anderen Hirnstrukturen wesentliche experimentelle Vorteile. Ganglienzellen, die allen anderen Neuronen nachgeschaltet sind und den Ausgang der Retina zu verschiedenen visuellen Kernen im Gehirn bilden, sind für elektrophysiologische Untersuchungen leicht zugänglich und lassen sich mit dem adäquaten Lichtreiz leicht stimulieren. Aufgrund der zweidimensionalen Schichtenstruktur sind Totalpräparate der Retina auch für quantitative anatomische Untersuchungen gut geeignet.

In den histologischen Untersuchungen im folgenden Teil 2 werden Neurone beschrieben, die vermutlich die exzitatorischen

Aminosäuren Aspartat/Glutamat und die inhibitorische Aminosäure Glycin als Transmitter benutzen. Die mutmaßlichen aspartergen/glutaminergen Neurone werden mit immunohistochemischen Methoden lokalisiert, dabei wird insbesondere auch die Problematik eines solchen Nachweises diskutiert. Die glycinergen Neurone werden mit einer autoradiographischen Technik dargestellt.

Im Teil 3 wird der Einfluß eines Aspartat/Glutamat Antagonisten sowie der Einfluß von Glycin und dessen Antagonisten Strychnin auf die Ganglienzellantwort beschrieben. Die Drogen wurden dabei in vivo iontophoretisch im optisch intakten Auge der Katze appliziert. Diese Methode ermöglicht bei physiologisch klassifizierten Ganglienzellen verschiedene Teile des rezeptiven Feldes selektiv zu stimulieren und die Wirkung der Drogen auf diese Lichtantworten zu untersuchen.

Schließlich wird im 4. Teil ein Neuropeptid untersucht, das die Ganglienzellantwort beeinflußt. Im Gegensatz zu den klassischen Transmittern ist über die funktionelle Bedeutung von Neuropeptiden noch wenig bekannt. Hier soll gezeigt werden, daß in der Retina ein Neuropeptid zusammen mit dem klassischen Transmitter Serotonin eine spezifische funktionelle Aufgabe übernehmen kann.

2. Histologische Untersuchungen

2.1 Einleitung

Curtis, Phillis und Watkins (1960) waren die ersten, die über Depolarisation von einzelnen Neuronen im Zentralnervensystem durch iontophoretische Applikation von Aspartat und Glutamat berichtet haben. Es existiert eine ausführliche Literatur, die sich mit der Erregung von Nervenzellen durch diese natürlich vorkommenden Aminosäuren befaßt, welche als hauptsächliche exzitatorische Neurotransmitter angesehen werden (Übersichtsarbeiten: Johnson, 1972; Krnjevic, 1974; Watkins und Evans, 1981).

In letzter Zeit wurde versucht, Neurone die Glutamat/Aspartat enthalten mit immunohistochemischen Techniken nachzuweisen. Aspartat-Aminotransferase (AAT) ist ein Schlüsselenzym in der Biosynthese von Aspartat/Glutamat. Es katalysiert die Transformation von Aspartat zu Oxalazetat und Alpha-Keto-Glutarat zu Glutamat. Mit Antikörpern, die gegen AAT gerichtet sind, ließ sich Immunoreaktivität in Neuronen des zentralen Nervensystems nachweisen (Recasens und Delannoy, 1981; Altschuler et al., 1981; 1982).

AAT ist jedoch kein eindeutiger Marker für asparterge/glutaminerge Neurone. AAT könnte ebenso GABAerge Neurone markieren, da eine hohe AAT-Konzentration notwendig sein könnte, um die für die GABA-Synthese notwendige

Glutamat-Konzentration aufrechtzuerhalten. Da über AAT der oxidative Abbau von Aspartat im Krebs-Zyklus vermittelt wird, könnte AAT auch ein Marker für metabolische Aktivität sein.

In der vorliegenden Studie an der Katzenretina wurde deshalb versucht, neben den AAT-haltigen Neuronen auch solche Neurone darzustellen, die GABA als Transmitter benützen. GABAerge Neurone wurden durch immunohistochemische Lokalisation von Glutamat-Decarboxylase (GAD) nachgewiesen (Roberts, 1978). Schließlich wurden diejenigen Neurone, die eine hohe metabolische Energie besitzen, mit der Cytochromoxidase-Reaktion markiert (Wong-Riley, 1979).

Es gibt eine Reihe von Untersuchungen die zeigen, daß Glycin ein inhibitorischer Neurotransmitter im Rückenmark und Hirnstamm ist (Aprison et al., 1968; Curtis et al., 1968; Kelly und Krnjevic, 1969; Hösli und Hösli, 1972; Johnston und Iversen, 1974). Glycin wird aber auch als Transmitter in der Retina von Vertebraten in Betracht gezogen. Das Vorhandensein von Glycin kann biochemisch in der Retina nachgewiesen werden (Pasantes-Morales et al., 1972; Starr, 1973; Voaden et al., 1974; Kennedy et al., 1977) und Glycin wird durch Lichtstimulation freigesetzt (Ehinger und Lindberg, 1974; Ehinger und Lindberg-Bauer, 1976). Es gibt ein hochaffines Aufnahmesystem für Glycin in der Retina (Bruun und Ehinger, 1972; Chin und Lam, 1980) und die kinetischen Parameter für dieses hochaffine Transportsystem in der Retina sind ähnlich wie bei Neuronen im Rückenmark. In der vorliegenden Untersuchung werden Glycin-akkumulierende Neurone in der Katzenretina autoradiographisch lokalisiert.

2.2 Methodik

2.2.1 Antiseren

AAT-Immunoreaktivität wurde mit einem Antiserum gegen das mitochondriale AAT Isoenzym nachgewiesen. Eine detailierte Beschreibung des Antikörpers findete sich in Recasens et al. (1980) und Recansens & Delannoy (1981). Der GAD Antikörper ist in Oertel et al. (1981) charakterisiert und beschrieben. Die Antiseren wurden freundlicherweise von M. Recasens, INSERM, Strasbourg und W. Oertel, Universitätsklinik München, zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Präparation

Erwachsene Katzen wurden tief mit Nembutal anästhesiert und die Augen herausgenommen. Das vordere Segment wurde weggeschnitten und der Augenbecher für 1-2 Stunden nach McLean und Nakone (1974) immersionsfixiert. Nach 12 Stunden Kryoprotektion in einer 30%igen Sukrose-Lösung in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.4, wurde der Augenbecher am Kryostaten geschnitten (Schnittdicke 10-15 µm). Die Schnitte wurden auf gelatinisierten Objektträgern aufgefangen, bei Zimmertemperatur getrocknet und bei -20°C bis zur immunohistochemischen Färbung gelagert.

Um Totalpräparate von der Retina herzustellen, wurden die Katzen mit 6% Dextran perfundiert, die Augen enukleiert und die Retina vom Pigmentepithel abgelöst. Die Retina wurde für 1-2 Stunden bei Zimmertempertur fixiert und für 1 Stunde in 10% normalem Ziegenserum und 0.5% Triton X-100 in 0.1 M Phosphatpuffer gewaschen. Die Retina wurde dann nach einer modifizierten Peroxidase-Antiperoxidase-Technik verarbeitet.

In zwei Katzen wurde Cholchicin (10 µg bzw. 100 µg in 50 µl Saline) in den Vitreus injiziert. Nach 24 Stunden wurden die Augen zum Schneiden vorbereitet oder zu retinalen Totalpräparaten verarbeitet.

2.2.3 Immunohistochemie

Retinaschnitte wurden nach der indirekten Immunofluoreszenztechnik verarbeitet (Brecha et al., 1981). Die Schnitte wurden in 0.1M Phosphatpuffer, pH 7.4 gewaschen und im primären Antiserum bei einer Verdünnung von 1:500 oder 1:1000 in Phosphatpuffer mit 0.3% Triton X-100 für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden in Phosphatpuffer gewaschen und in einem 2. Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 in 0.1 M Phosphatpuffer mit 0.3% Triton X-100 für 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Dieser 2. Antikörper war mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC) gekoppelt. Für die AAT-Immunohistochemie wurde Ziegenantikörper Immunoglobulin gegen Kaninchen und für die GAD-Immunohistochemie Ziegenantikörper Immunoglobulin gegen Schaf verwendet.

Schließlich wurden die Schnitte in Phosphatpuffer gewaschen und in gepuffertem Glycerin eingedeckt.

Retinale Totalpräparate wurden 4 Tage bei 4°C in primärem Antiserum in einer Verdünnung von 1:125 oder 1:250 in 0.5% Triton X-100 in 0.1 M Phosphatpuffer inkubiert. Die Retinae wurden dann in Phosphatpuffer gewaschen und für 2 Tage bei 4°C in Ziegenantikörper Immunoglobulin gegen Kaninchen (1:20) inkubiert. Die Retinae wurden dann gewaschen und für 2 Tage bei 4°C in Kaninchen-Peroxidase/Antiperoxidase (1:50) inkubiert. Die Retinae wurden wieder gewaschen und für 5 Minuten in Diaminobenzidin (35-70 mg/100 ml) inkubiert, anschließend 0.01% H_2O_2 hinzugegeben und für weitere 10 Min. inkubiert. Schließlich wurden die Retinae gewaschen, dehydriert, geklärt und eingedeckt.

Um die Spezifität der Immunoreaktivität zu testen, wurde das primäre Antiserum durch das Präimmunserum oder ein anderes Normalserum ersetzt.

2.2.4 Cytochromoxidase-Histochemie

Zum Nachweis der Cytochromoxidase-Aktivität in der Retina wurde das Protokoll von Wong-Riley (1979) modifiziert. Nach tiefer Anästhesie mit Nembutal wurden die Katzen perfundiert mit Saline, danach mit Karnovsky's Fixativ (1.25% Glutaraldehyd und 1% Paraformaldehyd in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.4), und danach

mit 10% Sukrose in 0.1 M Phosphatpuffer. Die Augen wurden herausgenommen und die Retina vom Pigmentepithel abgelöst. Die Retinae wurden für 5 Stunden bei 37°C in einem frisch angesetztem Medium inkubiert, das aus 25 mg Cytochrom C Typ VI (Sigma), 25 mg Diaminobenzidin und 2 g Sukrose in 50 ml 0.1 M Phosphatpuffer bestand. Die Retinae wurden dann gewaschen, dehydriert, geklärt und eingedeckt.

Bei einer Katze wurde vor der Verarbeitung für die Cytochromoxidase-Histochemie der spike-generierende Mechanismus mit Tetrodotoxin (TTX) blockiert. Hierzu wurde das Tier mit 2% Halothan in einer 2:1 Mischung aus Lachgas und Carbogen anästhesiert. Mit einer Hamilton-Spritze wurden 0.2 µg TTX in 10 µl Saline in den Glaskörper injiziert. Über 2 Wochen lang wurde diese TTX Injektion alle 2 Tage wiederholt.

2.2.5 Auswertung von retinalen Totalpräparaten

Zur quantitativen Auswertung wurden die markierten Zellen aus dem Mikroskop mit einem Zeiss-Zeichentubus und einem x 40 Objektiv (Zeiss, Neofluar) gezeichnet. Mit Hilfe eines halbautomatischen Bildanalyse-Systems (Leitz, A.S.M.) wurde aus diesen Zeichnungen die Verteilung der Zellkörpergröße bestimmt. Alpha-Ganglienzellen wurden mit einem x 16 Objektiv gezeichnet und anschließend gezählt.

Zum Vergleich wurde eine Retina mit Cresyl-Violett gefärbt, siehe Wässle et al. (1975). Das Zapfenmuster wurde aus einem Azan-gefärbten Totalpräparat bestimmt (Wässle und Riemann, 1978).

2.2.6 Autoradiographie

Für die autoradiographische Verarbeitung wurden die Retinae sofort nach der Enukleation in einem Krebs-Medium (Iversen et al., 1971) vom Pigmentepithel abgelöst. Retinastücke wurden in der Krebs-Lösung mit 10 M (^{3}H) Glycin (spezifische Aktivität 44.2 Ci/mmol) bei 37°C für 30 Min. inkubiert. Das Gewebe wurde dann in 1% Paraformaldehyd und 1.25% Glutaraldehyd in Phosphatpuffer fixiert, osmifiziert, dehydriert und in Epon eingebettet. Die Eponblöcke wurden 1 µm dick geschnitten, in Kodak NTB -2 Emulsion getaucht und bei 4°C für 1-6 Wochen belichtet. Anschließend wurden die Schnitte in Kodak D-19 entwickelt, mit Toluidin-Blau gegengefärbt, in Alkohol differenziert und eingedeckt.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 AAT Immunohistochemie

AAT-Immunoreaktivität wurde ausschließlich in Neuronen lokalisiert, Gliazellen wurden nicht markiert. Abb. 1 zeigt einen Vertikalschnitt durch die Retina: AAT-Immunoreaktivität bildet ein kontinuierliches Band in den inneren Segmenten der Photorezeptoren, AAT befindet sich in den Zapfenendfüßchen der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und in den Somata der Ganglienzellen. Abb. 1 b zeigt bei höherer Vergrößerung eine markierte Ganglienzelle und die Zapfenendfüßchen.

Colchicin-Behandlung ist oft benutzt worden, um ein Antigen im Zellkörper anzureichern. Jedoch ergab sich kein Unterschied in der AAT Immunoreaktivität zwischen Colchicin-behandelten und unbehandelten Retinae. Keine Markierung wurde gefunden, wenn das primäre Antiserum durch das Präimmunserum ersetzt wurde.

Zur quantitativen Auswertung wurden retinale Totalpräparate mit der Peroxidase-Antiperoxidase-Technik hergestellt. Abb. 2 zeigt ein solches Präparat mit der Fokusebene auf die Zapfenendfüßchen (Abb. 2 a) und auf die Ganglienzellschicht (Abb. 2 b).

Die Ganglienzellen der Katzenretina können morphologisch in verschiedene Klassen unterteilt werden (Boycott und Wässle, 1974). Aufgrund ihres großen Zellkörpers (ca. 30 µm) können

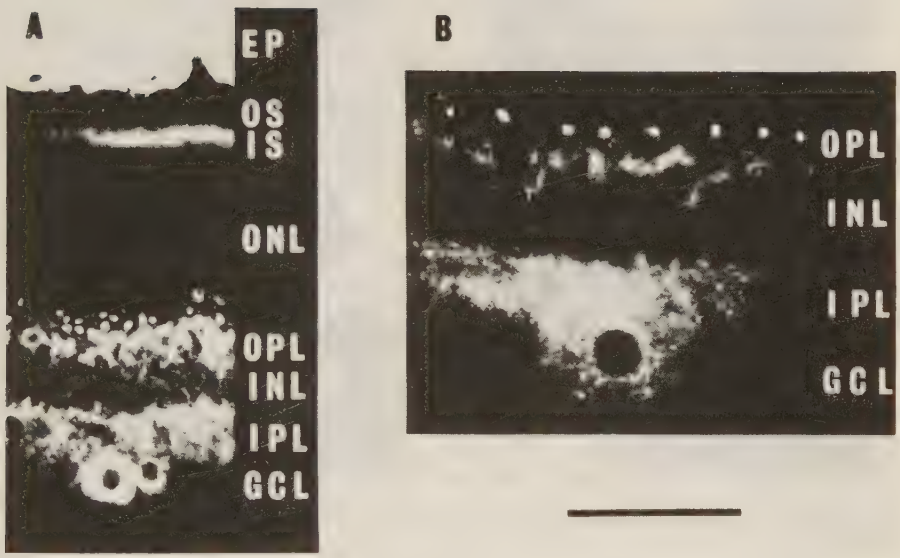

Abb. 1
(A) AAT-Immunoreaktivität an einem retinalen Vertikalschnitt. Immunofluoreszenz findet sich in den inneren Segmenten der Photorezeptoren, in den Zapfenendfüßchen und in den Ganglienzellen. (B) Bei höherer Vergrößerung sind die Zapfenendfüßchen und eine markierte Alpha-Zelle zu erkennen. Skala: 100 µm für A und 30 µm für B. Abkürzungen: EP = Pigmentepithel, OS= äußere Segmente der Photorezeptoren, IS = innere Segmente der Photorezeptoren, ONL = äußere nukleare Schicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere nukleare Schicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht.

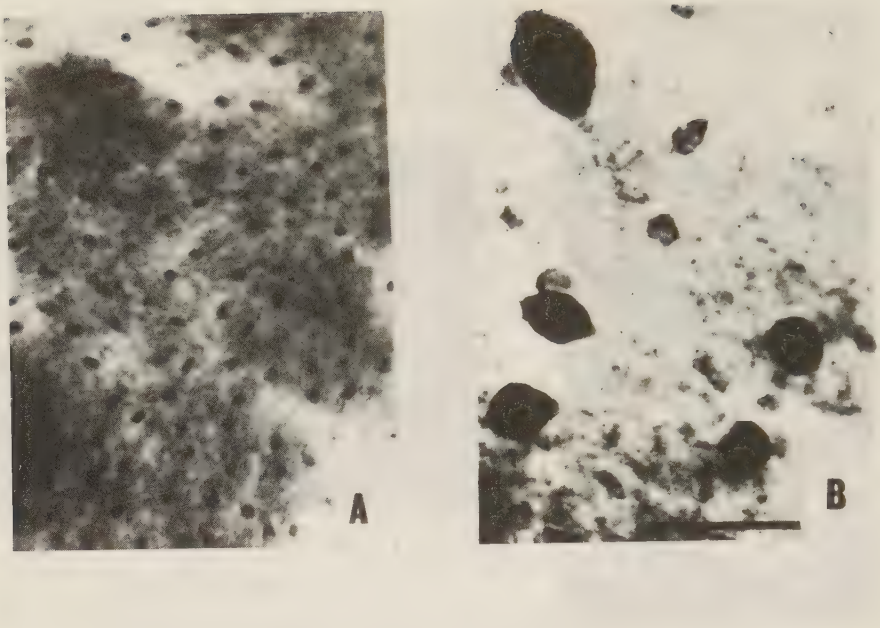

Abb. 2
AAT Immunoreaktivität am retinalen Totalpräparat, gefärbt mit der Peroxidase-Antiperoxidasetechnik. (A) Fokus auf die Zapfenendfüßchen, (B) Fokus auf die Ganglienzellschicht. Kalibrierung: 50 µm.

Alphazellen leicht bestimmt werden. Auszählung der Alphazellen in der peripheren unteren nasalen Retina ergab eine Dichte von 10 Zellen/mm², diese Alphazelldichte stimmt mit den Daten aus Cresyl-Violett-Präparaten überein (Wässle et al., 1975). Alphazellen werden also mit AAT-Immunoreaktivität quantitativ markiert.

Die mittelgroßen Betazellen und die kleinen Gammazellen sind schwieriger zu quantifizieren, da die kleinsten Betazellen mit den größten Gammazellen überlappen (Hughes, 1981). Darüberhinaus überlappen versetzte Amakrinzellen, also solche Amakrinzellen, die ihren Zellkörper in der Ganglienzellschicht (GCL) haben, mit den kleinsten Gammazellen (Hughes und Wienawa-Narkiewicz, 1980).

Abb. 3 a zeigt eine Camera Lucida-Zeichnung aller Zellen in der GCL, die mit AAT-Immunoreaktivität markiert wurden und Abb. 3 b zeigt alle Zellen in der GCL, die bei korrespondierender retinaler Exzentrizität mit Cresyl-Violett gefärbt wurden. Vergleicht man diese beiden Abbildungen, so hat man den Eindruck, daß sich die beiden Retinae hauptsächlich in der Zahl der kleinen Zellen unterscheidet.

Dies wurde durch eine statistische Analyse (Chi-Quadrat-Test) bestätigt, der keinen Unterschied in der Zahl der mittelgroßen Zellen (Soma-Durchmesser 11-30 µm) ergab ($p > 0.05$, n.s.). Dieses Spektrum von Zelldurchmessern enthält neben einigen größeren Gammazellen alle Betazellen, deshalb sind Betazellen

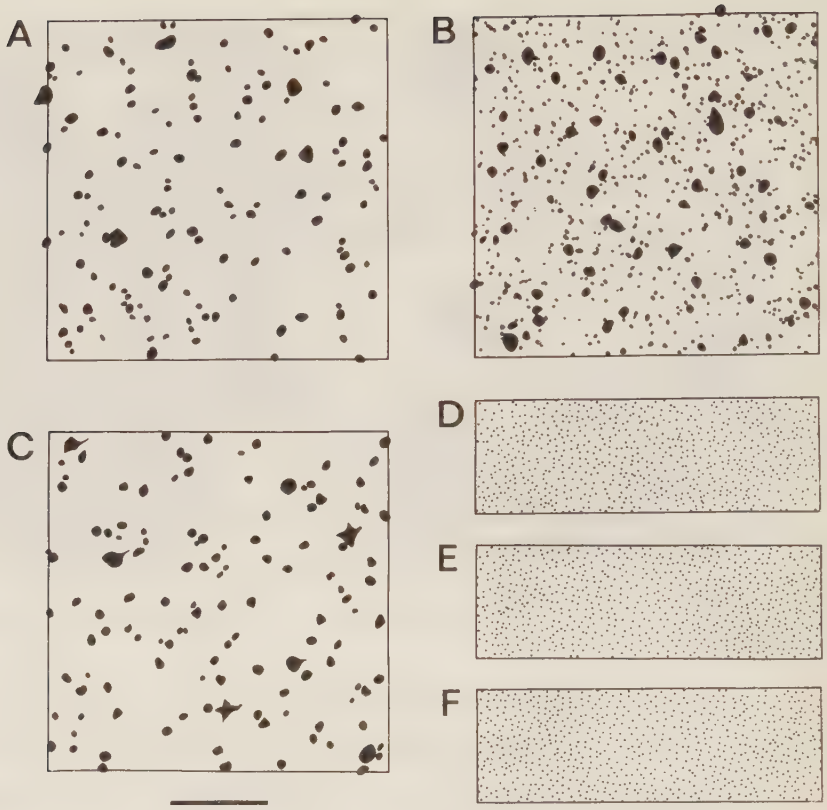

Abb. 3
(A-C) Zeichnung der Zellen in der Ganglienzellschicht; (A) AAT -Immunoreaktivität, (B) Cresyl-Violett-Präparat, (C) Cytochrom-oxidase-Reaktion. Die Präparate wurden an derselben retinalen Exzentrizität gezeichnet. Die Zahl der großen und mittleren Zellen war identisch, aber im Cresyl-Violett-Präparat wurden sehr viel mehr kleine Zellen gefärbt, als mit der AAT-Immunoreaktion und der Cytochromoxidase-Reaktion. (D-F) Zeichnung des Zapfenmosaiks in der peripheren Retina, (D) Azan-Präparat, (E) AAT-Immunoreaktion und (F) Cytochromoxidase-Reaktion. Die Zapfendichte war bei allen drei Färbungen identisch. Skala: 200 µm.

quantitativ mit AAT-Immunoreaktivität markiert. Die Zahl der Zellen mit Soma-Durchmesser von weniger als 11 µm ist signifikant kleiner in der AAT-markierten Retina als im Cresyl-Violett-Präparat ($p < 0.001$). Die meisten dieser kleinen Zellen sind Gliazellen, aber wahrscheinlich sind auch einige Neurone nicht mit AAT-Immunoreaktivität markiert.

Schließlich wurde das mit Azan gefärbte Zapfenmuster (Abb. 3 d) mit den AAT-markierten Zapfenendfüßchen (Abb. 3 b) verglichen. Im Azan-Präparat war die Dichte in der peripheren Retina 4200 Zapfen/mm² und im AAT-Präparat 4370 Zapfen/mm². Diese Zelldichten sind in Übereinstimmung mit den Daten von Steinberg et al., (1973), die an Toluidin-Blau gefärbten Präparaten gemessen wurden. Somit sind also alle Zapfenendfüßchen mit der AAT-Immunohistochemie markiert worden.

2.3.2 GAD-Immunohistochemie

GAD-Immunoreaktivität wurde im Somata der inneren nuklearen Schicht (INL) und in der GCL gefunden. Abb. 4 a zeigt, daß die markierten Neurone am inneren Rand der INL liegen, d.h. in der Schicht der Amakrinzellen; die markierten Somata in der GCL repräsentieren höchstwahrscheinlich versetzte Amakrinzellen. Darüberhinaus ist die IPL vollständig gefärbt, es gibt kein Anzeichen für eine Schichtung in der IPL. Keine GAD-Immunoreaktivität wurde in der OPL beobachtet.

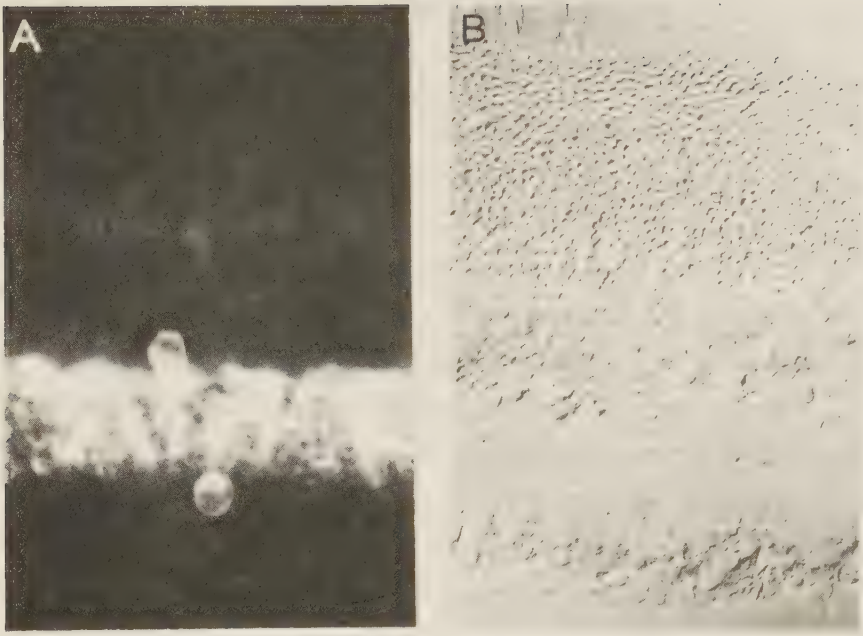

Abb. 4
(A) GAD-Immunofluoreszenz bei einem Vertikalschnitt durch die Retina. Zellkörper von Amakrinzellen, versetzten Amakrinzellen und die innere plexiforme Schicht sind deutlich markiert worden. (B) Kontrollschnitt: keine Färbung wurde erzielt, wenn das primäre Antiserum durch ein Normalserum ersetzt wurde.

Colchicin-Behandlung war ohne Einfluß auf das GAD-Färbemuster. Keine Färbung wurde erzielt, wenn das primäre Antiserum durch ein Normalserum ersetzt wurde (Abb. 4 b).

2.3.3 Cytochromoxidase-Aktivität

Endogene Cytochromoxidase-Aktivität in den Mitochondrien von Neuronen kann histochemisch nachgewiesen werden. Cytochromoxidase ist ein Maß für den oxidativen Metabolismus in Neuronen. Eine erniedrigte Enzymaktivität wurde im Geniculatum und visuellen Cortex der Katze nach visueller Deprivation (Wong-Riley, 1979) oder nach Blockade der primären visuellen Afferenzen mit TTX (Wong-Riley und Riley, 1983) gefunden. In der vorliegenden Untersuchung an der Katzenretina wurde die Cytochromoxidase-Reaktion verwendet, um die Zellen zu markieren, die eine vergleichsweise hohe metabolische Aktivität besitzen.

Mit der Cytochromoxidase-Histochemie wurden Reaktionsprodukte in Zapfenendfüßchen (Abb. 5 b) und in allen Klassen von Ganglienzellen nachgewiesen, d.h. große, mittlere und kleine Zellkörper von Ganglienzellen wurden markiert (Abb. 5 a).

Mit der Cytochromoxidase-Färbung wurde dieselbe quantitative Analyse durchgeführt, wie oben für die AAT-Immunoreaktivität beschrieben wurde. Alle Alphazellen wurden markiert. Die mittleren und kleinen Zellen in Abb. 3 c wurden mit dem äquivalenten Cresyl-Violett gefärbten retinalen Feld verglichen

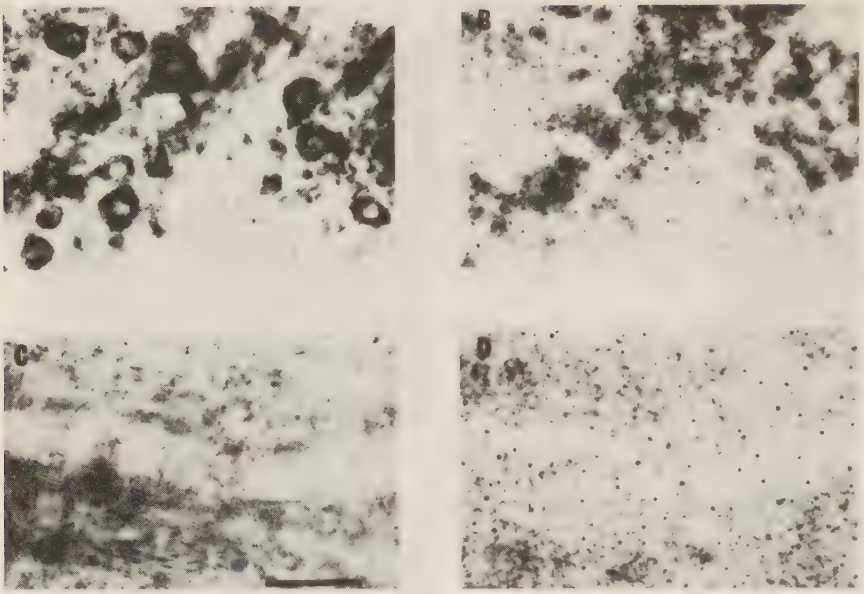

Abb. 5
Cytochromoxidase-Färbung von retinalen Totalpräparaten. (A,B) Unbehandelte Retina mit (A) Fokus auf die Ganglienzellschicht und (B) Fokus auf die Zapfenendfüßchen. (C, D) TTX-behandelte Retina mit (C) Fokus auf die Ganglienzellschicht und (D) Fokus auf die Zapfenendfüßchen. Nach Blockade des Spike-generierenden Mechanismus mit TTX war die Cytochromoxidase-Reaktion in der Ganglienzellschicht verschwunden. Skala: 50 µm

(Abb. 3 a). Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mittelgroßen Zellen ($p > 0.05$), dagegen war die Zahl der Zellen mit Somadurchmesser kleiner als 11 µm in der Cytochromoxidase-gefärbten Retina signifikant geringer ($p < 0.01$). Dies zeigt, daß alle Betazellen markiert wurden, während eine Unterklasse der heterogenen Gammazellen und /oder versetzte Amakrinzellen keine Cytochromoxidasereaktion aufweisen.

Die Größenverteilung der mit mAAT und Cytochromoxidase markierten Zellen war statistisch nicht zu unterscheiden ($p < 0.05$).

Das mit der Cytochromoxidase markierte Zapfenmosaik ist in Abb. 3 d gezeigt. Die Zapfendichte (4560 Zapfen/mm²) liegt in derselben Größenordnung wie die Dichte in der Azan-gefärbten Retina, somit sind also alle Zapfen mit der Cytochromoxidase-Reaktion markiert worden.

In der Retina finden sich spikende Neurone fast ausschließlich unter den Ganglienzellen. Die hohe oxidative Kapazität der Ganglienzellen, die mit der Cytochromoxidase-Reaktion nachgewiesen wurde, könnte also auf den Spike-generierenden Mechanismus dieser Zellen zurückzuführen sein. Um diese Hypothese zu testen, wurde in einem Auge der Spike-generierende Mechanismus der Ganglienzellen mit TTX blockiert. Als die TTX behandelte Retina anschließend auf Cytochromoxidase gefärbt wurde, fand sich dasselbe Markierungsmuster in den Zapfenendfüßchen wie in den

unbehandelten Retinae (Abb. 5 d). Dagegen wurden in der Ganglienzellschicht keine Zellen mehr markiert (Abb. 5 c), was darauf hinweist, daß in der Tat die Spike-Aktivität der Ganglienzellen für deren hohe metabolische Aktivität verantwortlich ist.

2.3.4 Glycin-akkumulierende Zellen

Glycin wurde hauptsächlich von Neuronen aufgenommen, Gliazellen wurden nur schwach oder überhaupt nicht markiert. Eine Verdichtung von Silberkörnern fand sich ausschließlich über Zellen der INL, Zellen der GCL wurden nicht markiert: Weiter fand sich Glycin in den oberen Laminae der IPL, während die unterste C-Lamina nicht oder nur schwach markiert wurde.

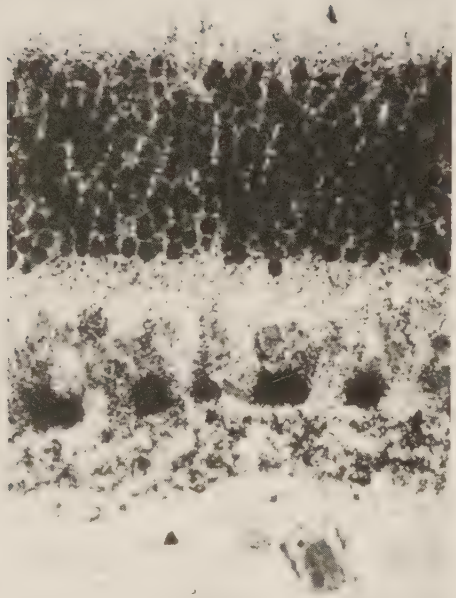

Abb. 6
Vertikalschnitt durch die Retina, Autoradiogramm nach ^{3}H-Glycin Aufnahme. Nur Zellen in der inneren nuklearen Schicht nehmen Glycin auf. Die innere plexiforme Schicht wurde ebenfalls markiert.

2.4 Diskussion

2.4.1 AAT-Immunohistochemie: Aktivitätsmarker oder Marker für Transmitterfunktion?

Mit einem Antiserum, daß gegen das mitochondriale Isoenzym von AAT gerichtet war, wurde in der Retina ein spezifisches Markierungsmuster erhalten. AAT wurde ausschließlich in Neuronen lokalisiert, nämlich in Zapfenendfüßchen und in allen Klassen von Ganglienzellen. AAT wurde als Marker für Neurone, die Aspartat/Glutamat als Neurotransmitter benutzen, vorgeschlagen (Altschuler et al., 1981). Gemäß dieser Hypothese wären also in der Katzenretina Zapfen und Ganglienzellen asparterg/glutaminerg. Die Interpretation der AAT-Immunoreaktivität ist jedoch nicht so einfach.

GABA wird aus Glutamat synthetisiert. Es ist also denkbar, daß auch GABAerge Neurone eine hohe AAT-Konzentration besitzen, um die für die GABA-Synthese notwendige Menge an Glutamat zu synthetisieren. Tatsächlich wurden in der Rattenretina Amakrinzellen mit AAT markiert, die aber höchstwahrscheinlich GABA als Transmitter benutzen (Brandom und Lam, 1983). Glutamat wird durch Glutamat-Decarboxylase (GAD) zu GABA decarboxiliert, GAD ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der GABA-Synthese. Der Nachweis von GAD gilt als reliabler Marker für GABAerge Neurone. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß das Färbemuster von AAT-Immunoreaktivität und GAD-Immunoreaktivität weitgehend disjunkt ist. Während GAD in Amakrinzellen und in

der IPL gefunden wurde, konnte AAT nur in Zapfenendfüßchen der OPL und in Zellen der GCL nachgewiesen werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die versetzten, GAD-positiven Amakrinzellen auch AAT-Immunoreaktivität besitzen.

Mit der Cytochromoxidase-Histochemie wurden in der Retina diejenigen Neurone markiert, die eine relativ hohe oxidative Kapazität besitzen. Es wurde gezeigt, daß Cytochromoxidase auf dem zellulären Niveau lokalisiert werden kann: Reaktionsprodukt wurde in allen Klassen von Ganglienzellen und in allen Zapfenendfüßchen gefunden.

In früheren biochemischen Untersuchungen wurde gezeigt, daß die äußere Retina einen hohen Metabolismus aufweist (Cohen und Noell, 1965; Voaden, 1979). Die Ergebnisse mit der Cytochromoxidase-Reaktion zeigen, daß die hohe metabolische Aktivität in der äußeren Retina auf die Zapfen zurückzuführen ist.

Überraschender war die intensive Cytochromoxidase-Anfärbung von Ganglienzellen. Durch Blockierung der Aktionspotentiale der Ganglienzellen mit TTX konnte die Cytochromoxidase-Konzentration in diesen Zellen signifikant verringert werden. Da die Cytochromoxidase-Reaktion in den nicht-spikenden Zapfen durch TTX nicht beeinflußt wurde, kann ein unspezifischer Effekt von TTX auf die Cytochromoxidase-Reaktion ausgeschlossen werden. Somit kann die Cytochromoxidase-Histochemie benutzt werden, um Aktivitätsänderungen einzelner Zellen nachzuweisen. Die hohe metabolische Aktivität der Ganglienzellen in der normalen Retina ist auf ihren Spike-generierenden Mechanismus zurückzuführen.

Mit der Cytochromoxidase-Reaktion wurden dieselben Populationen von Neuronen markiert, wie mit der AAT-Immunoreaktion. Dies wurde durch eine quantitative Analyse der markierten Zellen bestätigt. Bedeutet dies, daß die mutmaßlichen aspartergen/glutaminergen Neurone in der Retina auch einen hohen oxidativen Metabolismus besitzen? Es gibt Evidenzen aus anderen Hirnarealen, daß die Cytochromoxidase in Neuronenpopulationen zu finden ist, die einen ganz bestimmten Transmiter benutzen. Hendrickson et al. (1981) berichtet, daß im visuellen Cortex des Affen das Färbemuster mit Cytochromoxidase identisch ist mit der GAD-Immunoreaktivität. Da in der Retina die Cytochromoxidase-Reaktion verschieden von der GAD-Immunoreaktivität ist, könnte in der Retina Cytochromoxidase mit aspartergen/glutaminergen Neuronen assoziiert sein.

Da AAT den Abbau von Aspartat im Krebs-Zyklus katalysiert, kann AAT-Immunoreaktivität auch nur ein Marker für Zellen mit hoher metabolischer Aktivität sein, welche nicht notwendigerweise Aspartat/Glutamat als Transmitter benutzen. Tatsächlich scheinen die Versuche mit der Cytochromoxidase eine solche Interpretation nahezulegen.

Es gibt jedoch Anhaltspunkte aus physiologischen Studien, daß Ganglienzellen und Zapfen in der Katzenretina asparterg/glutaminerg sind. Kemp und Sillito (1982) zeigten im Geniculatum der Katze, daß die visuelle Antwort von X und Y-Ganglienzellen durch die iontophoretische Applikation von

Antagonisten zu Glutamat/Aspartat blockiert wird. Dies ist in Übereinstimmung mit der AAT-Immunoreaktivität in allen großen und allen mittleren Ganglienzellen. Die in Teil 3 beschriebenen iontophoretischen Experimente in der Retina liefern Evidenz dafür, daß Aspartat/Glutamat auch der Photorezeptor- Transmitter sein könnte.

2.4.2 Lokalisation von Glycin in der Retina

Bei der autoradiographischen Lokalisation von Glycin-akkumulierenden Neuronen ergaben sich Unterschiede zwischen den Retinae von niederen Vertebraten und Säugern. Beim Goldfisch und bei Necturus wurde Glycin von Amakrinzellen in der inneren Retina aufgenommen, aber auch von interplexiformen Zellen, welche ihre Fortsätze in die innere und äußere plexiforme Schicht senden (Mark und Lam, 1981; Rayborn et al., 1981). Darüberhinaus berichtete Ehinger (1981) über Horizontalzellen in der Goldfischretina, die Glycin aufnahmen. Im Gegensatz dazu wurde bei der Ratte und beim Kaninchen Glycin ausschließlich in der inneren Retina gefunden (Ehinger und Falck, 1971; Marshall und Voaden, 1974).

Bei der Katze konnten McGuire et al. (1980) durch Serienrekonstruktion von elektronenmikroskopischen Schnitten zeigen, daß Bipolarzellen Gylcin aufnehmen. Pourcho (1980) fand nach intravitrealer Glycininjektion markierte Amakrinzellen und Ganglienzellen. Während bei in vitro Inkubation eine definierte Glycinkonzentration leicht einzustellen ist, kommt es bei in

vivo Inkubation zu beträchtlichen Konzentrationsgradienten über der Retina. Die von Pourcho (1980) beobachtete Markierung von Ganglienzellen könnte deshalb auf eine hohe Glycin-Konzentration zurückzuführen sein, bei der diese Zellen Glycin über das unspezifische, niederaffine Transportsystem aufnehmen.

3. Physiologische Untersuchungen

3.1 Einleitung

In der Katzenretina gibt es mehrere physiologische Klassen von Ganglienzellen, deren rezeptives Feld antagonistisch in Zentrum/Umfeld organisiert ist und jede dieser Klassen kann weiterhin in ON- und OFF-Zentrums-Zellen aufgeteilt werden (Enroth-Cugell und Robson, 1966; Cleland und Levick, 1974 a, 1974 b; Stone und Fukuda, 1974). ON-Zentrums-Zellen werden durch Licht im rezeptiven Feldzentrum erregt und durch Licht im Umfeld unterdrückt. Die Entladung von OFF-Zentrums-Zellen wird durch Licht im Zentrum unterdrückt und durch Licht im Umfeld verstärkt.

ON- und OFF-Information ist also getrennt, sowohl innerhalb des rezeptiven Feldes einer einzelnen Zelle als auch zwischen verschiedenen Typen von Zellen innerhalb einer physiologischen Klasse. Diese Separierung der ON- und OFF-Information wirft eine Reihe von Fragen über die retinale Verschaltung auf. Es ist zwar bekannt, daß die ON- und OFF-Information schon auf der Ebene der Bipolar-Zellen getrennt ist, aber es ist nicht bekannt, ob es einen gemeinsamen Bipolar-Eingang auf alle ON- bzw. OFF-Ganglienzellen gibt. Es ist auch nicht bekannt, ob das Zentrum einer ON-Ganglienzelle und das Umfeld einer OFF-Ganglienzelle einen gemeinsamen Bipolar-Eingang erhalten, obwohl beide durch Licht erregt werden.

Studien an Retinae von niederen Vertebraten legen nahe, diese Fragen mit pharmakologischen Methoden anzugehen. Slaughter und Miller (1981) zeigten an Eye-Cup-Präparaten von Necturus, daß 2-Amino-4-Phosphonobuttersäure (APB) die Lichtanwort von ON-Bipolarzellen blockiert, Rezeptorzellen, Horizontalzellen und OFF-Bipolarzellen aber unbeeinflußt ließ. Diese Blockade von ON-Bipolarzellen führte in der inneren Retina zu einer Unterdrückung der ON-Antworten von Amakrinzellen und Ganglienzellen. In den Abschnitten 3.3.1 bis 3.3.3 wird der Einfluß von iontophoretisch appliziertem APB auf die Ganglienzellantwort in der Katzenretina beschrieben.

Die meisten physiologischen Untersuchungen über die glycinerge Inhibition in der Retina, wurden mit dem Glycinantagonisten Strychnin durchgeführt, da diese Droge im Gegensatz zu Glycin leicht die Blut-Retina-Schranke passiert. Schon 1928 haben Adrian und Matthews nach Strychnin-Applikation rhythmische Entladungen im optischen Nerven des Aals gefunden. Ähnliche Gruppenentladung wurde nach intravenöser Injektion von Strychnin bei Ganglienzellen in der Katzenretina beobachtet (Heiss und Bornstein, 1965; Heiss, 1967; Straschill, 1968). In späteren Studien wurden auch spezifischere Effekte von systemisch appliziertem Glycin auf die Ganglienzellantwort in der Katzenretina berichtet. Chu (1968) fand, daß die Inhibition von OFF-Zellen, nicht aber die von ON-Zellen durch Strychnin blockiert wird. Kirby (1979) hingegen berichtete, daß Strychnin nur X-,nicht aber Y-Zellen beeinflußt, unabhängig davon ob die Zellen ON- oder OFF-Zellen waren. Saito (1981) fand an der

isolierten Katzenretina, daß die Umfeld-Inhibition von ON-X-Zellen durch Strychnin blockiert wurde, während die Umfeld-Inhibition der anderen Ganglienzellen durch Strychnin nicht beeinflußt wurde.

Diese Untersuchungen zeigen, daß Glycin eine Transmitterfunktion in der Retina hat, vorausgesetzt Strychnin ist tatsächlich ein spezifischer Antagonist zu Glycin. Die Ergebnisse sind im einzelnen jedoch recht widersprüchlich. In den Abschniten 3.3.5 und 3.3.6 wird die Wirkung von iontophoretisch appliziertem Gylcin und Strychnin auf die Ganglienzellantwort beschrieben. Diese Technik ermöglicht, direkt den Einfluß von lokal appliziertem Glycin zu untersuchen und sie erlaubt weiterhin, Strychnin ohne systemische Nebenwirkungen zu applizieren.

3.2. Methodik

3.2.1 Präparation

Die Experimente wurden an adulten Katzen durchgeführt. Die Anästhesie wurde mit 4% Halothan in einem 2:1 Gemisch aus Lachgas und Carbogen eingeleitet. Während der Operation wurde die Anästhesie mit 1-2% Halothan aufrechterhalten. Eine Tracheakanüle wurde eingeführt und die Katze wurde mit intravenöser Infusion von Flaxedil (5 mg/kg*h) und D-Tubocurarin (0.5 mg/kg*h) in isotonischer Glucoselösung paralysiert. Während des ganzen Versuchs wurde das Tier künstlich beatmet. Das Atemgas bestand aus einem Gemisch von 70% Lachgas, 28.5% Sauerstoff und 1.5% Kohlendioxyd. Das Atemvolumen wurde so eingestellt, daß der expiratorische CO_2-Gehalt 4% betrug (Schlagzahl 33/min). Zusätzlich wurde noch Nembutal intravenös verabreicht (1 mg/kg*h). Es ist gezeigt worden, daß diese Kombination von Nembutal mit Lachgas eine geeignete Anästhesie bei der Katze aufrechterhält (Hammond, 1978).

Der Kopf des Tieres wurde in einem stereotaktischen Kopfhalter fixiert. In einigen Versuchen wurden Reizelektroden in den optischen Trakt stereotaktisch positioniert. Um den Augapfel während des Versuches weitmöglichst stillzulegen, wurde die Bindehaut an einem Ring festgenäht. Dann wurde eine Kanüle durch die Sklera in den Glaskörper eingestochen, durch welche die Ableitelektrode auf die Retina vorgeschoben werden konnte. Das optische System der Katze (Cornea, Linse) war durch den

Ableitapparat nicht beeinflußt. Die Corneae wurden durch Kontaktlinsen mit einer künstlichen Pupille (4 mm Durchmesser) geschützt. In einigen Versuchen wurde die Refraktion des Auges gemessen und gegebenenfalls so korrigiert, daß die Katze den vor ihr stehenden Projektionsschirm (Abstand 172 cm) scharf sah. Atropin-Sulfat (1%) wurde verwendet, um die Akkomodation auszuschalten und die Pupille zu öffnen. Eine reversible Fundus-Kamera wurde benutzt, um den blinden Fleck und die area centralis auf den Projektionsschirm zurückzuspiegeln. Die Qualität der Augenoptik wurde regelmäßig überprüft, bei leichter Trübung der Cornea wurde die Epithelschicht vorsichtig abgebürstet. Die Versuche gingen über 3-5 Tage und wurden beendet, sobald es zu einer Eintrübung des Glaskörpers kam.

3.2.2 Ganglienzellklassifikation

Die meisten Ganglienzellen, von denen abgeleitet wurde, waren entweder X- oder Y-Zellen. Gelegentlich wurden Zellen aus anderen Klassen abgeleitet, jedoch nicht detailiert untersucht.

Wenn mit der Elektrode die Aktivität einer einzelnen Zelle isoliert werden konnte, wurde deren rezeptives Feldzentrum mit einem kleinen Lichtpunkt auf dem Schirm ausgemessen. Bei gleicher Exzentrizität haben Y-Zellen einen etwa dreimal größeren rezeptiven Felddurchmesser als X-Zellen (Peichl und Wässle, 1979). Die axonale Leitungsgeschwindigkeit von Y-Zellen ist schneller als die von X-Zellen (Cleland et al., 1971; Stone und Hoffmann, 1971), deshalb wurde bei einigen Experimenten die

antidrome Latenz auf elektrische Reizung im optischen Trakt gemessen. In Kombination mit verschiedenen optischen Tests (Antwort auf stehenden Kontrast, Peripherie-Effekt, Empfindlichkeit auf Größe und Geschwindigkeit von Reizen; Cleland et al., 1973) konnten die Ganglienzellen eindeutig klassifiziert werden.

3.2.3 Optische Stimulation und Datenauswertung

Zentrumsantworten wurden mit zeitlich modulierten Lichtpunkten von der Größe des rezeptiven Feldzentrums evoziert. Umfeldantworten wurden mit Lichtringen gemessen, deren innerer Durchmesser dem rezeptiven Feldzentrum angeglichen wurde und deren äußerer Durchmesser 20° betrug. Die Lichtreize wurden in 512 msec Intervallen an- und ausgeschaltet. Die Antworten auf 16 oder 32 Lichtreize wurden mit einem Computer gemittelt und als Poststimulus-Time-Histogramm (PSTH) dargestellt (Bin-Breite 7.5 msec oder 15 msec). Die Spontanaktivität der Ganglienzellen wurde bei homogener Hintergrundsbeleuchtung gemessen oder aus den PSTH's ermittelt (s. unten).

Aus den PSTH's konnten verschiedene Parameter der Zellantwort berechnet werden: eine phasische Komponente, definiert als die mittlere Entladung während der ersten 90 msec nach Reizbeginn und eine tonische Komponente, definiert als die mittlere Entladung zwischen 150 und 450 msec nach Reizbeginn. Die Maximalentladung und die mittlere Entladung über die ganze

Reizperiode wurden ebenfalls berechnet.

Die mittlere Entladung während der letzten 90 msec vor Reizbeginn (Licht-an für ON-Zellen, Licht-aus für OFF-Zellen) wurde als Schätzung für den Beitrag der Spontanaktivität zur Lichtantwort gewählt. Diese geschätzte Spontanaktivität war im Mittel 80% der 'wahren' Spontanaktivität, welche vor oder nach Lichtstimulation gemessen wurde. Die geschätzte und die 'wahre' Spontanaktivität waren hoch korreliert ($r= 0.94$, $p < 0.01$, $n=33$). Unter der Annahme, daß sich die Lichtantwort und die Spontanaktivität additiv zusammensetzen, wurde eine 'spezifische' Lichtantwort durch Subtraktion der geschätzten Spontanaktivität von der im PSTH gemessenen Aktivität erhalten. Abb. 7b illustriert die verschiedenen Parameter der Zellantwort.

PSTH's sind gemittelte Antworten, sie sind daher ungeeignet für die Analyse des Zeitverlaufes der Drogenwirkung. Deshalb wurde noch zusätzlich die integrierte Entladung über einen einzelnen Reizzyklus (1024 msec) kontinuierlich registriert.

3.2.4 Iontophorese in der Retina

Ganglienzellen wurden mit einer speziellen Wolfram-in-Glas Elektrode (Levick, 1972) extrazellulär abgeleitet. Siebenfach-Pipetten wurden mit einem konventionellen Elektrodenpuller gezogen und die Spitze auf 4-5 µm abgebrochen. Ein elektrolytisch zugespitzter Wolfram-Draht wurde durch den zentralen Kanal vorgeschoben, bis er 10-15 µm aus der Glasspitze

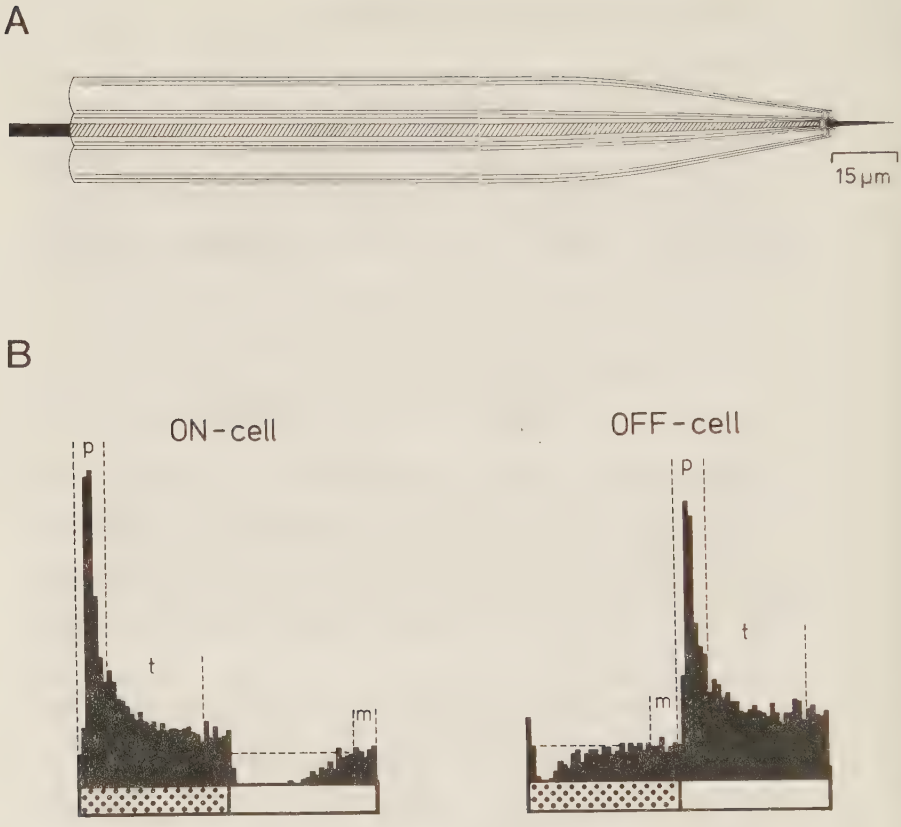

Abb. 7
(A) Mehrfachelektrode für die intraokulare Iontophorese. Mit dem Wolframdraht im zentralen Kanal wurden Ganglienzellen extrazellulär abgeleitet. Gleichzeitig konnten Drogen aus den anderen Kanälen appliziert werden. (B) Parametrisierung der Lichtantwort bei einer ON-Zelle (links) und einer OFF-Zelle (rechts). Ein Lichtpunkt bedeckte das rezeptive Feld der Zellen und wurde in 512 msec Intervallen an und ausgeschaltet; Licht-an ist durch die schraffierte Fläche gekennzeichnet. P: phasische Komponente; T: transiente Komponente; m: geschätzte Spontanaktivität. Weitere Einzelheiten im Text.

herausragte. Der Draht wurde am anderen Ende an das Glas mit DeKhotinsky-Zement angeklebt. Die Drogen wurden in Wasser oder Saline gelöst und mit einer Hamilton-Spritze in die äußeren Kanäle gefüllt. Diese äußeren Kanäle enthielten ein inneres Glasfilament, so daß die Spitze kapillar gefüllt wurde. Abb. 7 a zeigt eine Skizze der Elektrode.

DL-APB (0.1 M; Calbiochem) wurde in Wasser gelöst und mit NaOH auf pH 7-8 eingestellt. Strychnin (0.5 mM oder 5 mM; Sigma) wurde in Saline, Glycin (0.1 M oder 1 M; Sigma) wurde in Wasser gelöst und mit HCl auf pH 3-4 eingestellt. In einigen Experimenten wurde ein zusätzlicher Kanal mit Saline gefüllt. Dieser Saline-Kanal diente zur Strombalance, d.h. über ihn wurde ein Strom von gleicher Größe, aber umgekehrter Polarität wie die Summe aller Ströme in den anderen Kanälen appliziert (Salmoiraghi und Weight, 1967; Bloom, 1974). Der Saline-Kanal wurde auch dazu benutzt, um mögliche elektronische Effekte zu zu testen. Ströme in beide Richtungen bis zu 120 nA hatten jedoch keinen Einfluß auf die Ganglienzellantwort, deshalb wurde in späteren Versuchen der Saline-Kanal weggelassen.

In der Retina sind Axonableitungen aus der Faserschicht recht häufig. Bei diesen Ableitungen kann die Elektrodenspitze weit entfernt vom Zellkörper und dem Dendritenbaum sein. Iontophoretisch applizierte Drogen können dann die Synapsen der jeweiligen Ganglienzellen und die der vorgeschalteten Neurone nicht erreichen. Da das rezeptive Feldzentrum mit dem Dendritenbaum der Ganglienzelle übereinstimmt (Peichl und

Wässle, 1983), wurde die Elektrodenspitze auf den Schirm zurückgespiegelt. Aus der Lage der Elektrodenspitze relativ zum markierten rezeptiven Feld konnte eindeutig bestimmt werden, ob die Zelle vom Axon oder vom Zellkörper bzw. den Dendriten abgeleitet wurde.

Um eine spontane Diffusion der Drogen aus der Elektrode zu verhindern, wurde ein Strom von 5-15 nA angelegt, der die umgekehrte Polarität wie der Strom zum Freisetzen der Drogen hatte. Abb. 8 illustriert die Wirkung dieses Haltestromes. Die schraffierte Fläche zeigt, daß das ohne Haltestrom gemessene rezeptive Feldzentrum eine ungewöhnliche Einbuchtung hat. Nachdem die Messung mit Haltestrom wiederholt wurde, ergab sich ein konventionelles, konvexes rezeptives Feldzentrum (durchgezogene Linie in Abb. 8). Die anschließend zurückgespiegelte Elektrodenspitze lag genau in der Einbuchtung des rezeptiven Feldes, was vermuten läßt, daß durch passive Diffusion der Droge eine lokale Unterdrückung erzielt wurde. Diese Vermutung wurde durch ein weiteres Experiment erhärtet. Wird nämlich ein kleiner Lichtpunkt auf die Elektrodenspitze projiziert, so wird diese Lichtantwort von APB drastisch unterdrückt (siehe PSTH's in Abb. 8, rechts). Wird der Testpunkt von der Elektrodenspitze weg an den Rand des rezeptiven Feldes projiziert, so ist die Kontrollantwort kleiner als zuvor, da der Reiz jetzt in einem weniger empfindlichen Teil des rezeptiven Feldes liegt (PSTH's in Abb. 8, links). In Übereinstimmung mit der nun vergrößerten Diffusionsstrecke wird jetzt aber die Lichtantwort von APB weit weniger unterdrückt als zuvor. Dieses

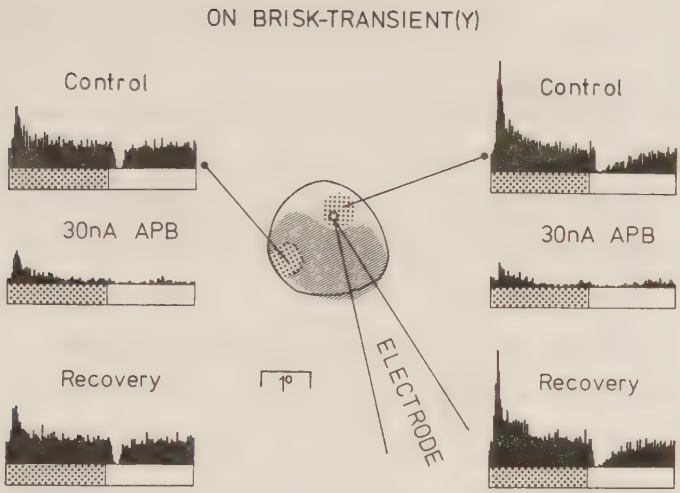

Abb. 8
Lokale Wirkung der Iontophorese. Wird das rezeptive Feldzentrum ohne Haltestrom gemessen, so erhält man am Ort der Elektrodenspitze eine Einbuchtung (schraffierte Fläche). Erneute Messung unter Haltestrom ergibt ein konventionelles, konvexes rezeptives Feldzentrum (durchgezogene Linie). Wird die Zelle durch einen kleinen Lichtpunkt (Durchmesser 0.7°) an der Elektrodenspitze gereizt, so wird die Antwort durch APB auf 22% des Ausgangsniveaus gedrückt (PSTH's rechts). Ist der Lichtpunkt von der Elektrodenspitze entfernt (PSTH's links), dann wird die Antwort durch APB nur noch auf 52% unterdrückt. In diesen und allen folgenden PSTH's ist Licht-an durch die schraffierte Fläche markiert; die Höhe des Stimulus-Markers entspricht 67 Spikes/Sek. Reiz 7.6 cd/m²; Hintergrund 3.4 cd/m².

Experiment konnte mehrfach wiederholt werden und ist somit nicht auf eine Veränderung der Elektrodeneigenschaft zurückzuführen. Mit der iontophoretischen Technik in der Retina ist es also möglich, lokale pharmakologische Effekte innerhalb des Dendritenbaumes nachzuweisen.

3.3. Ergebnisse

3.3.1 Wirkung von APB auf ON-Zentrumszellen

Abb. 9 zeigt den Einfluß von APB auf eine repräsentative ON-X und ON-Y-Zelle. In beiden Zellklassen unterdrückt APB die Spontanaktivität und die Lichtantwort. Die X-Zelle (Abb. 9 d-f) wurde mit 30 nA APB fast vollständig unterdrückt. Wenn nur 5 nA appliziert wurden, war die Zellantwort weniger stark unterdrückt, vergleichbar dem Effekt von 30 nA auf die Y-Zelle. Dies ist wahrscheinlich kein prinzipieller Unterschied zwischen den beiden Zellklassen, sondern ist auf die verschiedene Größe ihres rezeptiven Feldes zurückzuführen. Wie in Abb. 8 schon gezeigt wurde, kann unter bestimmten Voraussetzungen auch bei einer Y-Zelle eine den X-Zellen entsprechende Unterdrückung erzielt werden.

Abb. 10 zeigt die Antwort einer ON-Y-Zelle vor, während und nach APB-Applikation. Nach Abschalten des APB-Stromes erhöht sich die Entladungsrate der Zelle rasch über das Ausgangsniveau und fällt dann langsam wieder zurück. Die PSTH's zeigen, daß während APB-Applikation sowohl die phasische als auch die tonische Komponente der Lichtantwort reduziert wird. In der rebound-Phase nach APB-Applikation wird die Zellantwort jedoch tonischer.

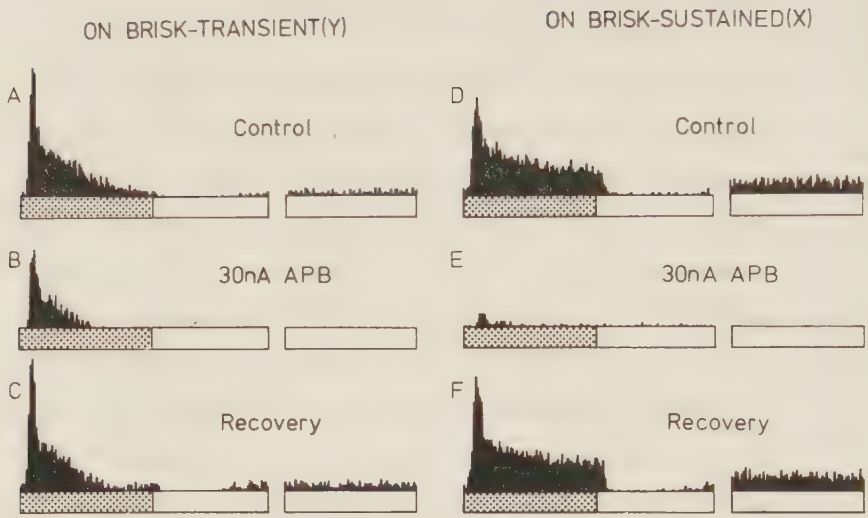

Abb. 9
APB unterdrückt die Lichtantwort und die Spontanaktivität von ON-Ganglienzellen. (A-C) ON-Y-Zelle, (D-F) ON-X-Zelle; links Lichtantwort, rechts Spontanaktivität. Die Zellen wurden mit einem Lichtpunkt von der Größe ihres rezeptiven Feldzentrums gereizt (2.9° Durchmesser bei der Y-Zelle; 1.0° Durchmesser bei der X-Zelle). Reiz 3.0 cd/m², Hintergrund 1.5 cd/m².

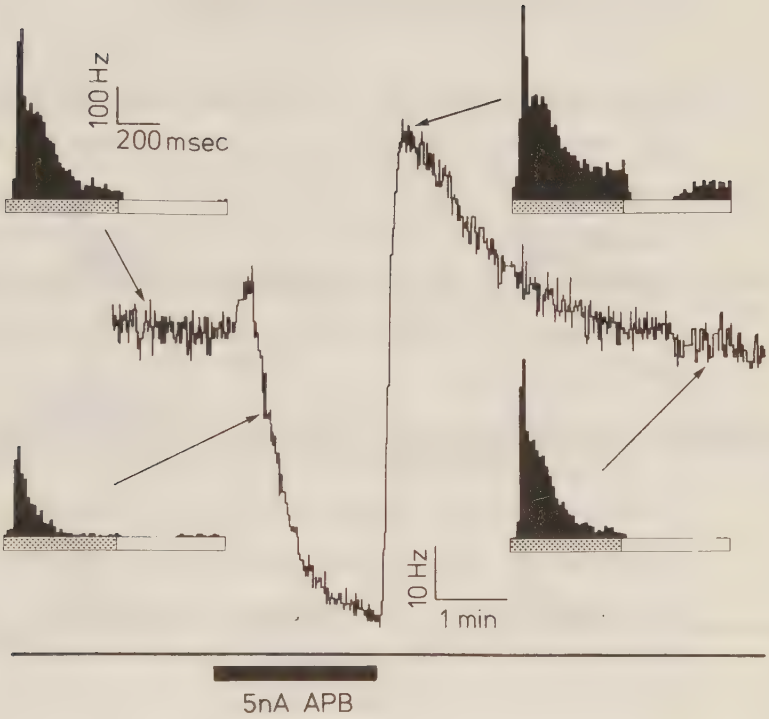

Abb. 10
Zeitverlauf der APB-Wirkung bei einer ON-Y-Zelle. Die kontinuierliche Registrierung zeigt die über jeden Stimulus-Zyklus (1024 msec) integrierte Lichtantwort; die untere Gerade entspricht der Null-Linie und die Dauer der APB-Applikation ist durch den Balken markiert. Die PSTH's wurden über 32 Reize gemittelt, die Pfeile zeigen in der kontinuierlichen Registrierung auf den ersten Reiz, der zur Mittelwertsbildung herangezogen wurde. Lichtpunkt 2.6° Durchmesser; Reiz 8 cd/m², Hintergrund 3.4 cd/m². Die obere Kalibrierung bezieht sich auf die PSTH's, die untere auf die kontinuierliche Registrierung.

3.3.2 Wirkung von APB auf OFF-Zentrumszellen

OFF-Zellen werden von APB anders beeinflußt als ON-Zellen. Die OFF-Y- und OFF-X-Zelle in der Abb. 11 haben eine mäßige Spontanaktivität, geben aber eine deutliche Antwort auf das Ausschalten des Lichtpunktes in ihrem rezeptiven Feldzentrum. Applikation von APB verursacht eine drastische Erhöhung der Spontanaktivität von beiden Zellen, während die Lichtantwort nur wenig beeinflußt wird.

Die kontinuierliche Aufzeichnung in Abb. 12 zeigt, daß es bei OFF-Zellen zu einem schnellen Anstieg der Entladungsrate nach APB-Applikation kommt. Nach dem Abschalten des APB-Stromes wird die Zelle unter das Ausgangsniveau gedrückt, in dieser rebound-Phase wird die Zellantwort transient. Wie bei den ON-Zellen, dauert auch bei OFF-Zellen die Erholung von der APB-Wirkung länger als das Einsetzen des Drogeneffektes.

Um den Einfluß von APB auf die Zentrumsantwort zu bestimmen, wurde der veränderten Spontanaktivität Rechnung getragen (s. 3.2.3). Die spezifische Lichtantwort wurde für 20 ON- und 17 OFF-Zellen gemessen. Abb. 13 zeigt, daß APB die Antwort der ON-Zellen unterdrückt, während die Antwort der OFF-Zellen nur schwach und variabel von APB beeinflußt wird.

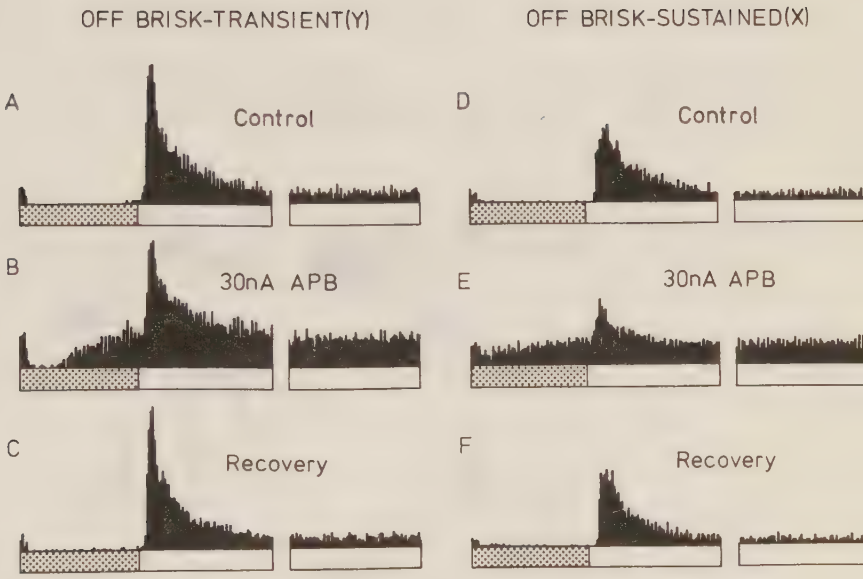

Abb. 11
APB erhöht die Spontaktivität von OFF-Ganglienzellen, während die Lichtantwort nur wenig beeinflußt wird. (A-C) OFF-Y-Zelle, (D-F) OFF-X-Zelle. Gleiche Reizparameter wie in Abb. 9.

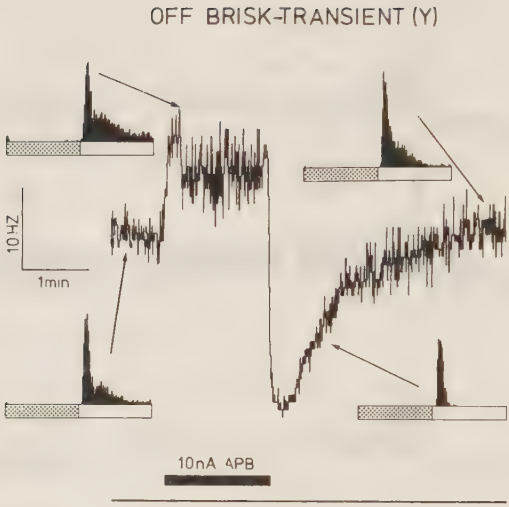

Abb. 12
Zeitverlauf der APB-Antwort bei einer OFF-Y-Zelle. Selbe Darstellung wie in Abb. 10. Lichtpunkt 3.0° Durchmesser; Reiz 7.5 cd/m², Hintergrund 3.5 cd/m².

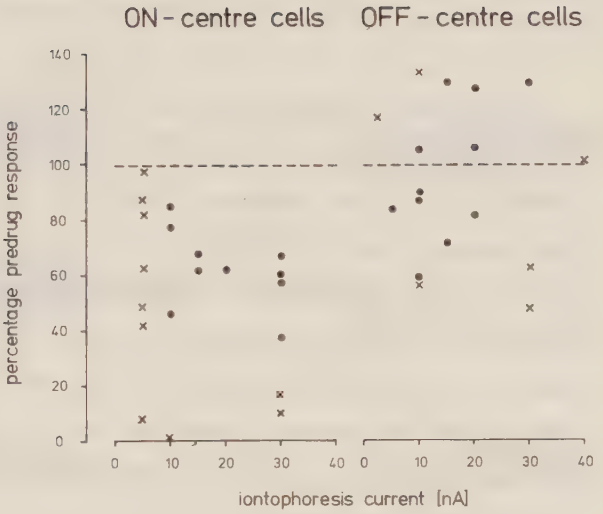

Abb. 13
Wirkung von APB auf die spezifische Lichtantwort. Aufgetragen wurde die Maximal-Entladung minus Spontanaktivität nach APB-Applikation in Prozent des Ausgangswertes. Jedes Symbol repräsentiert eine verschiedene Zelle: (x) X-Zellen, (.) Y-Zellen.

3.3.3 Wirkung von APB auf die Umfeldantwort

Das rezeptive Feld von X- und Y-Zellen besitzt ein antagonistisches Umfeld. Mit Stimulation durch Lichtringe wurde der Einfluß von APB auf die Umfeldantwort gemessen.

Da APB die Zentrumsantwort von ON-Zellen blockierte war es von Interesse zu sehen, ob die ON-Umfeldantwort von OFF-Zellen ebenfalls durch APB blockiert wurde. Abb. 14 a-c zeigt die Umfeldantwort einer OFF-Y-Zelle. Die kleine Antwort bei Licht-aus ist wahrscheinlich der räumlichen Überlappung von Zentrum und Umfeld zuzuschreiben (Cleland et al., 1973). APB bewirkt eine Erhöhung der Spontanaktivität, aber die spezifische Umfeldantwort wird nur wenig beeinflußt (Abb. 14 b). Der Einfluß von APB ist also vergleichbar dem Einfluß von APB auf die Zentrumsantwort bei diesem Zelltyp.

Abb. 8 d-f zeigt die Umfeldantwort einer ON-Y-Zelle. Die Antwort wurde unter APB deutlich reduziert, vergleichbar wieder dem Einfluß auf die Zentrumsantwort bei diesem Zelltyp (vergl. Abb. 9). APB zeigt also gegensätzliche Effekte auf ON- und OFF-Zellen unabhängig von der Zellklasse und unabhängig davon, welcher Teil des rezeptiven Feldes stimuliert wurde. Der Einfluß von APB auf die Umfeldantwort von X-Zellen war ähnlich wie der Einfluß auf die hier gezeigten Y-Zellen.

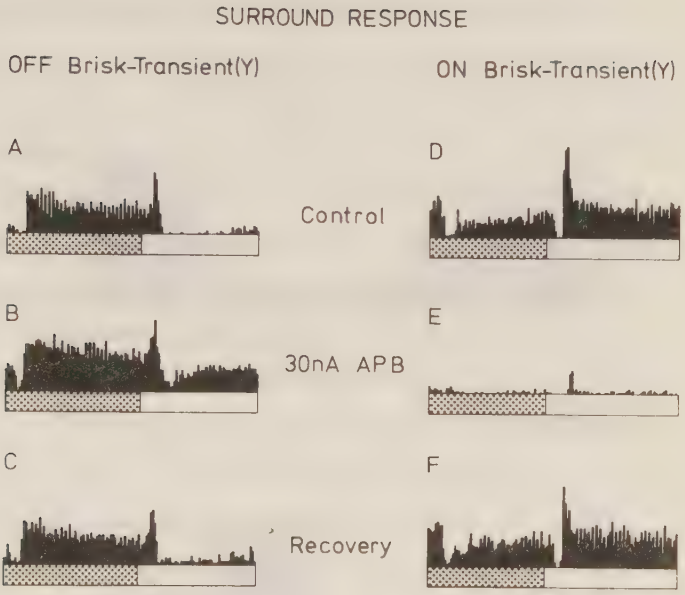

Abb. 14
Umfeldantworten von Y-Zellen auf einen Lichtring mit äußerem Durchmesser von 20° und einem inneren Durchmesser entsprechend der Größe des rezeptiven Feldzentrums (2.6° bei der OFF-Zelle, 3.3° bei der ON-Zelle). (A-C) APB erhöht die Spontanaktivität der OFF-Zellen, die Umfeldantwort wird aber nur wenig beeinflußt. (D-F) Die Umfeldantwort von ON-Zellen wird dagegen durch APB unterdrückt. Reiz 3.0 cd/m², Hintergrund 1.5 cd/m².

3.3.4 Die umgekehrte APB-Antwort

Die Mehrheit der untersuchten Zellen antwortete auf APB wie in den vorausgegangenen Abschnitten beschrieben. Jedoch zeigten 17 von 73 Zellen eine veränderte Antwort auf APB (5 ON- und 4 OFF-X-Zellen, 4 ON- und 4 OFF-Y-Zellen). Nach APB-Applikation wurde die Entladungsrate von ON-Zellen dieser Zellkategorie erhöht und die von OFF-Zellen erniedrigt. Die Drogenantwort war also gerade entgegengesetzt wie bei der Mehrzahl der Zellen und im Folgenden wird dies die 'umgekehrte APB-Antwort' genannt. Jedoch zeigten diese Zellen vor und/oder nach der umgekehrten APB-Antwort wieder eine 'normale' APB-Antwort.

Abb. 15 a zeigt das Beispiel einer OFF-Y-Zelle, bei der die Spontanaktivität durch APB unterdrückt wurde. Der Zeitverlauf dieser umgekehrten Antwort ist beträchtlich langsamer als die normale APB-Wirkung und dies wurde konsistent bei allen Zellen mit einer umgekehrten APB-Antwort. Die Spontanaktivität dieser Zelle war relativ hoch, unter Dunkeladaptation erniedrigte sich die Spontanaktivität und die APB-Antwort wurde wieder normal. Nachdem die Zelle wieder hell adaptiert wurde, war die Spontakaktivität weiterhin niedrig und APB unterdrückte nun die Spontanaktivität. Diese normale Antwort hatte den üblichen schnellen Zeitverlauf (Abb. 15 b).

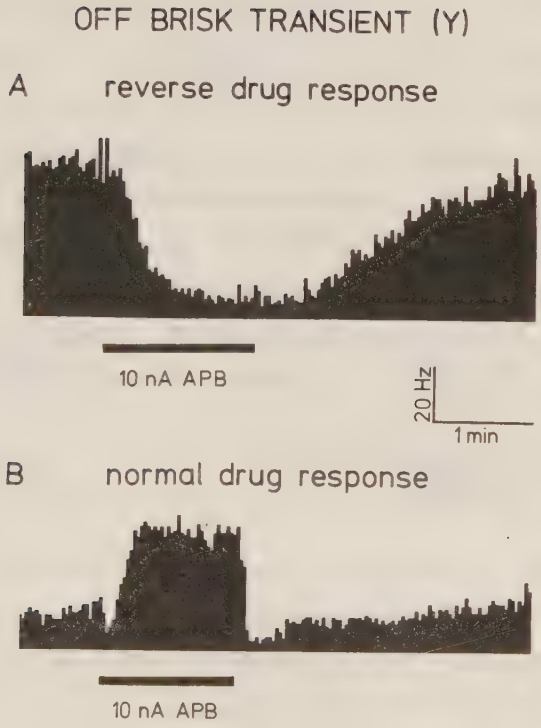

Abb. 15
Umgekehrte APB-Antwort bei einer OFF-Y-Zelle. (A) Im Gegensatz zu den meisten anderen OFF-Zellen wurde die Spontanaktivität dieser Zelle durch APB unterdrückt. Der Zeitverlauf der umgekehrten APB-Antwort ist langsamer als bei der normalen APB-Antwort. Beachte die relativ hohe Spontanaktivität der Zelle. (B) Bei niederer Spontanaktivität antwortet dieselbe Zelle normal auf APB. Hintergrund 1.7 cd/m²; Bin-Weite 2 Sek.

Die umgekehrte Antwort war nicht auf die Spontanaktivität beschränkt. Abb. 16 a-c zeigt eine ON-X-Zelle, die auf APB so reagiert, wie es normalerweise bei OFF-Zellen gefunden wurde (vergl. Abb. 11). Nach Erhöhung des Hintergrundlichtes antwortete diese Zelle normal auf APB-Applikation (Abb. 16 d-f). Obgleich diese Beispiele nahelegen, daß der Übergang von der normalen zur umgekehrten APB-Antwort mit Veränderungen des Hintergrundlichtes zusammenhängt, war dies nicht immer der Fall. Einige Zellen antworteten auch nach Erhöhung oder Erniedrigung des Hintergrundlichtes weiterhin umgekehrt auf APB. Darüberhinaus war die normale APB-Antwort, wie sie bei der Mehrheit der Zellen gefunden wurde, unabhängig von der Hintergrundsbeleuchtung.

Um zu testen, ob die umgekehrte APB-Antwort mit der Spontanaktivität zusammenhängt, wurde bei einigen Zellen die Spontanaktivität pharmakologisch mit inhibitorischen Aminosäuren oder deren Antagonisten manipuliert. Alle Versuche, die Spontanaktivität mit der umgekehrten APB-Antwort zu korrelieren, schlugen jedoch fehl.

Zellen mit umgekehrter APB-Antwort wurden sowohl zu Beginn als auch am Ende eines Experimentes abgeleitet. Die Zellen waren über das ganze Ableitgebiet verstreut und Zellpaare mit überlappenden rezeptiven Feldern wurden abgeleitet, bei denen die eine Zelle eine umgekehrte APB-Antwort und die andere eine normale Antwort zeigte. Schließlich konnte auch keine Korrelation zwischen der umgekehrten APB-Antwort und der Dauer oder Stärke der APB-Applikation gefunden werden.

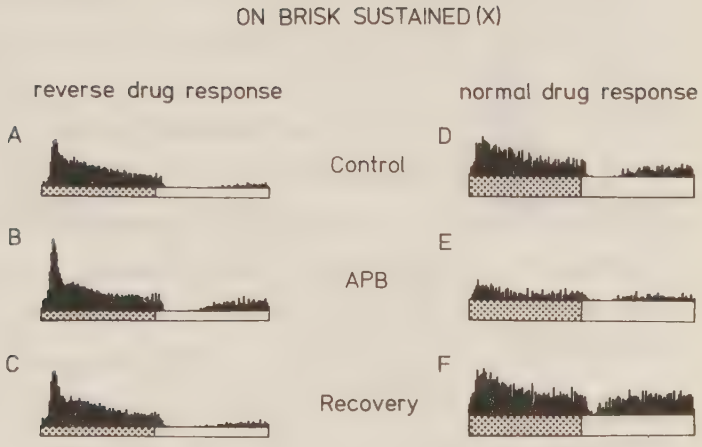

Abb. 16
Umgekehrte und normale APB-Antwort einer ON-X-Zelle. (A-C) Umgekehrte Drogenantwort bei 1.7 cd/m² Hintergrund: APB erhöht die Entladung der Zelle. (D-E) Normale Drogenantwort bei 31.0 cd/m²: APB unterdrückt die Zellantwort.

3.3.5 Wirkung von Glycin auf die Zentrumsantwort

Abb. 17 zeigt die Zentrumsantwort einer ON-Y-Zelle. Wie aus der kontinuierlichen Registrierung klar zu erkennen ist, wird die Zellantwort durch Glycin unterdrückt und durch Strychnin verstärkt. Die vollständige Antwort auf Glycin stellte sich nach 8-12 Sek. ein und 1-3 Sek. nach Abschalten des Stromes war die Zelle auf das Ausgangniveau zurück gekehrt. Die Antwort auf Strychnin hatte in etwa den gleichen Zeitverlauf wie die auf Glycin, aber im Gegensatz zu Glycin dauerte es sehr lange bis sich die Zelle von der Strychnin Applikation erholt hatte. Die PSTH's in Abb. 17 machen deutlich, daß die Unterdrückung durch Glycin und die Verstärkung durch Strychnin in der tonischen Komponente der Antwort sehr viel stärker ausgeprägt ist als in der phasischen Komponente.

Abb. 18 zeigt die Antwort einer OFF-Y-Zelle auf das Ausschalten eines Reizlichtes in ihrem rezeptiven Feldzentrum. Ein kurzer Puls von iontophoretisch appliziertem Strychnin verursacht eine lang andauernde Erhöhung der Zellentladung, während Glycin zu einer raschen Unterdrückung der Zellantwort führt. Die PSTH's zeigen, daß wieder die tonische Entladung mehr beeinflußt wurde als die phasische Antwort. Die Zentrumsantwort von X-Zellen wurde in gleicher Weise beeinflußt wie die hier gezeigten Y-Zellen.

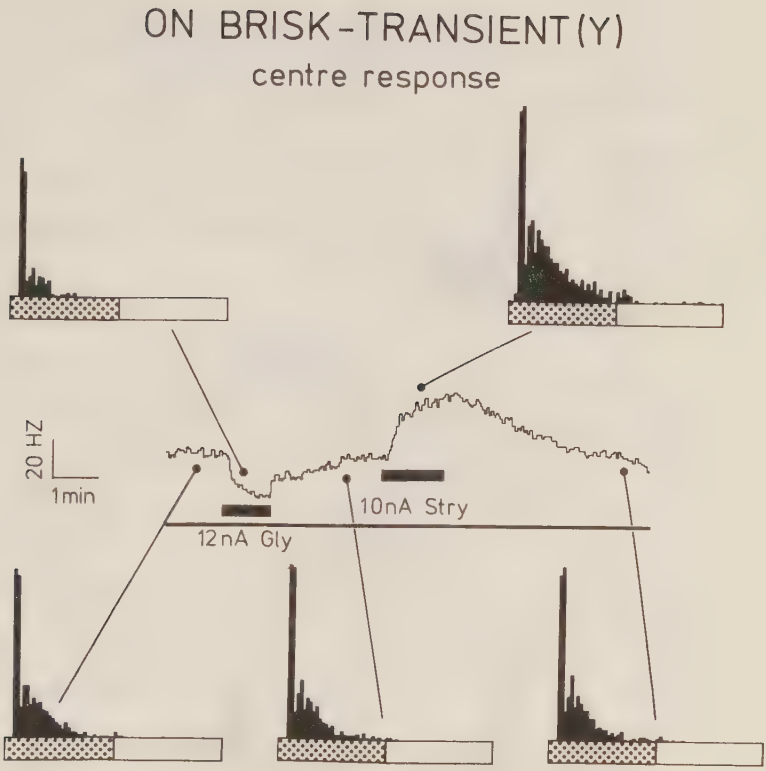

Abb. 17
Einfluß von Glycin und Strychnin auf die Zentrumsantwort einer ON-Y-Zelle. Selbe Darstellung wie in Abb. 10. Lichtpunkt 3.0° Durchmesser; Reiz 8.5 cd/m², Hintergrund 5.0 cd/m².

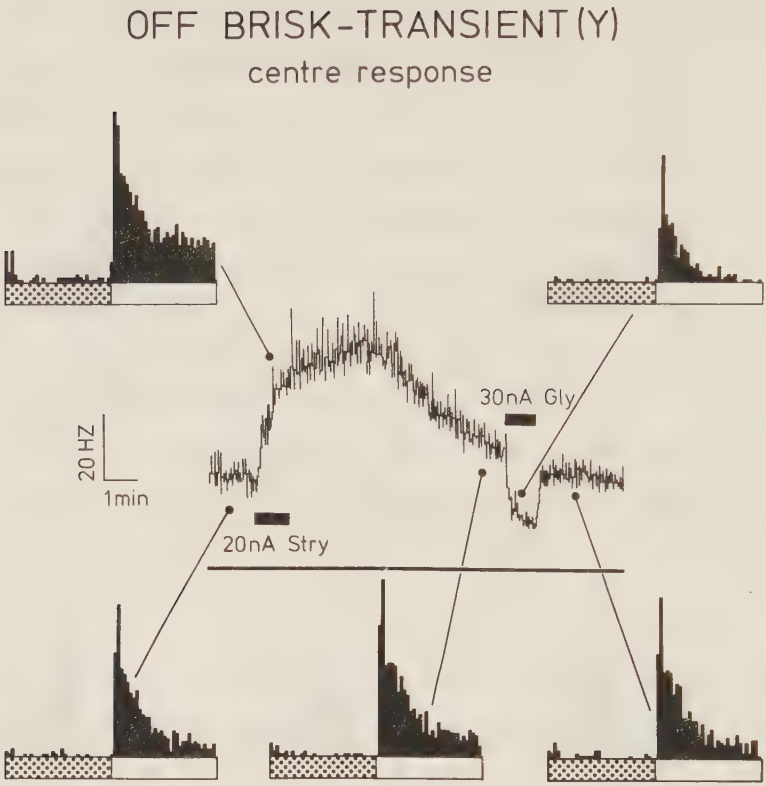

Abb. 18
Einfluß von Glycin und Strychnin auf die Zentrumsantwort einer OFF-Y-Zelle. Selbe Darstellung wie in Abb. 10. Lichtpunkt 2.5° Durchmesser; Reiz 8.5 cd/m², Hintergrund 5.0 cd/m².

Um zu testen, ob es tatsächlich einen differenziellen Einfluß der Drogen auf die verschiedenen Komponenten der Lichtantwort gab, wurde die prozentuale Veränderung der Maximalentladung und der tonischen Entladung separat berechnet. Tab. 1 gibt die über 10 ON- und 10 OFF-Zellen gemittelten Werte an. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, wird die tonische Antwort von den Drogen deutlich beeinflußt, während die Maximalentladung sich nur wenig ändert.

Glycin und Strychnin beeinflußten die Spontanaktivität auf dieselbe Art wie die Zentrumsantwort: Glycin unterdrückte und Strychnin erhöhte die Dauerentladung der Ganglienzellen. Dies ist in Abb. 19 für eine ON-Y-Zelle gezeigt.

Die drogeninduzierte Veränderung der Spontanaktivität geht in dieselbe Richtung wie die Veränderung der Zentrumsantwort. Ist deshalb der Drogeneffekt bei Zentrumstimulation nur auf den Beitrag der Spontanaktivität zur Lichtantwort zurückzuführen? Um diese Möglichkeit zu testen, wurde die geschätzte Spontanaktivität von der Zentrumsantwort abgezogen und der Einfluß von Glycin und Strychnin auf diese spezifische Lichtantwort berechnet. Diese Werte sind in Tab. 1 in Klammern angegeben. Die Daten zeigen, daß auch nach dieser Korrektur die tonische Antwort von Glycin unterdrückt und von Strychnin verstärkt wird, während die Maximalentladung von Drogen wenig verändert wird.

	Glycin	Strychnin
Maximalentladung	75% (80%)	112% (106%)
tonische Entladung	39% (44%)	203% (150%)

Tab. 1

Wirkung von Glycin und Strychnin auf die Maximalentladung und die tonische Entladung, Werte in Klammer nach der Korrektur des Beitrags der Spontanaktivität.

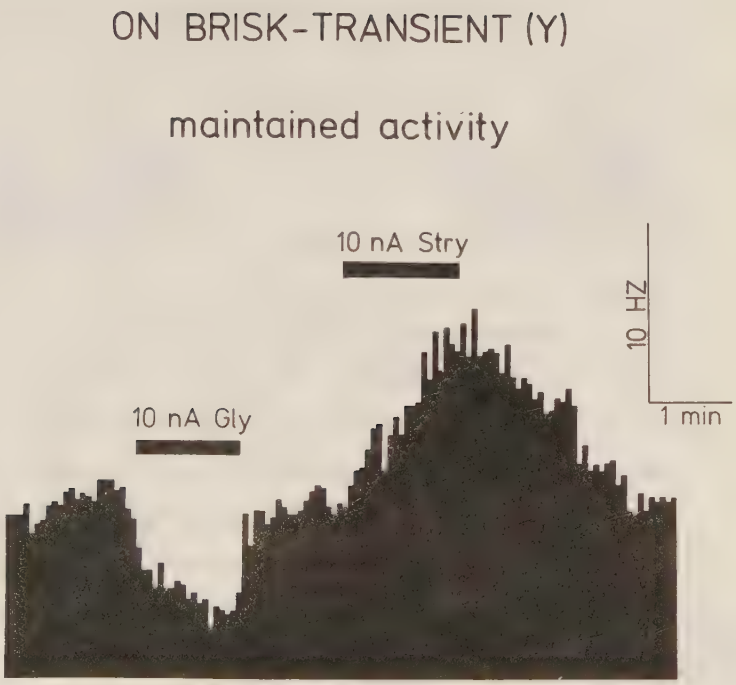

Abb. 19
Glycin erniedrigt und Strychnin erhöht die Spontanaktivität von Ganglienzellen. Hintergrund 5 cd/m²; Bin-Weite 4 Sek.

3.3.6 Wirkung von Glycin auf die Umfeldantwort

Die mit Lichtringen hervorgerufene exzitatorische Umfeldantwort wurde von den Drogen auf die gleiche Weise beeinflußt wie die oben beschriebene Zentrumsantwort: Glycin unterdrückt und Strychnin verstärkt die Umfeldantwort.

Ein möglicher Effekt der Drogen auf die Balance zwischen dem Zentrums- und Umfeldmechanismus wurde mit Lichtreizen getestet, die eine gemischte Zentrums-/Umfeldantwort hervorrufen. Hierzu wurden Lichtringe verwendet, deren innerer Durchmesser kleiner als das rezeptive Feldzentrum war. Ein Beispiel einer solchen gemischten Zentrums-/Umfeldantwort bei einer OFF-Y-Zelle ist in Abb. 20 gezeigt. Die Drogen beeinflußten sowohl die Umfeldantwort bei Licht-an, als auch die Zentrumsantwort bei Licht-aus. In Abb. 21 ist die drogeninduzierte Veränderung der Umfeldantwort als Funktion der Änderung der Zentrumsantwort für 11 verschiedene Zellen gezeigt. Die Meßpunkte sind entlang der ersten Winkelhalbierenden gestreut, die Zentrums- und die Umfeldantwort werden also durch Glycin und Strychnin gleich stark beeinflußt. Dies wurde durch eine statistische Analyse bestätigt, die keinen signifikanten Unterschied zwischen Zentrums- und Umfeldunterdrückung mit Glycin (p 0.48, $n=11$; Vorzeichentest) bzw. Erhöhung durch Strychnin (p 0.39, $n=11$) ergab.

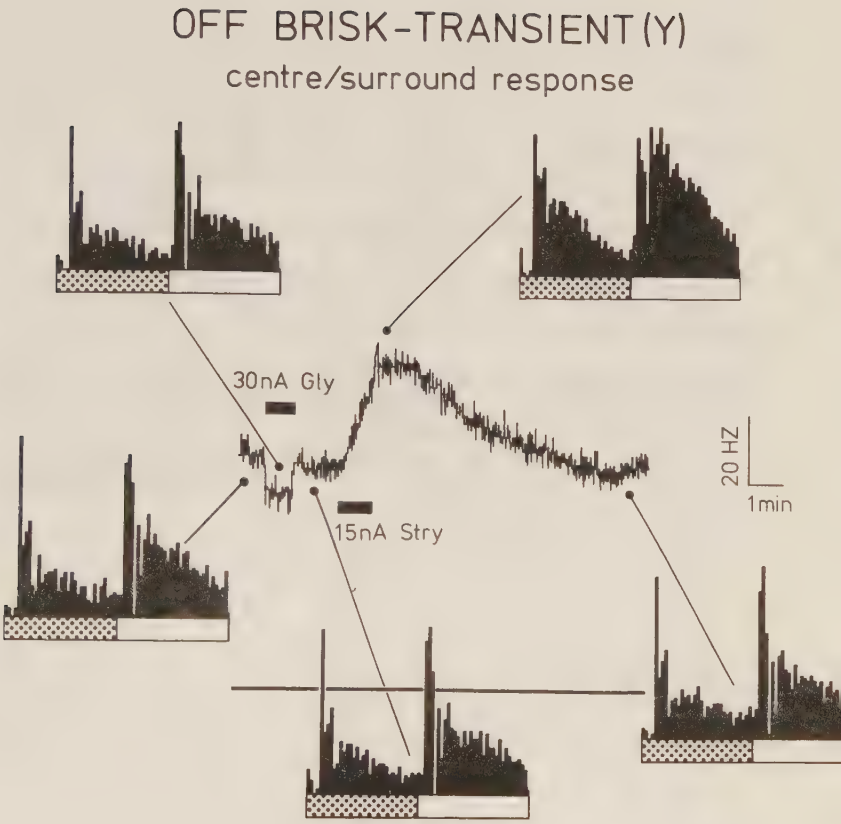

Abb. 20
Gemischte Zentrums/ Umfeldantwort einer OFF-Y-Zelle bei Stimulation mit einem Lichtring (innerer Durchmesser 1°, äußerer Durchmesser 23°). Die Drogen hatten dieselbe Wirkung auf die Zentrums- und Umfeldantwort. Stimulus 8.5 cd/m², Hintergrund 5 cd/m².

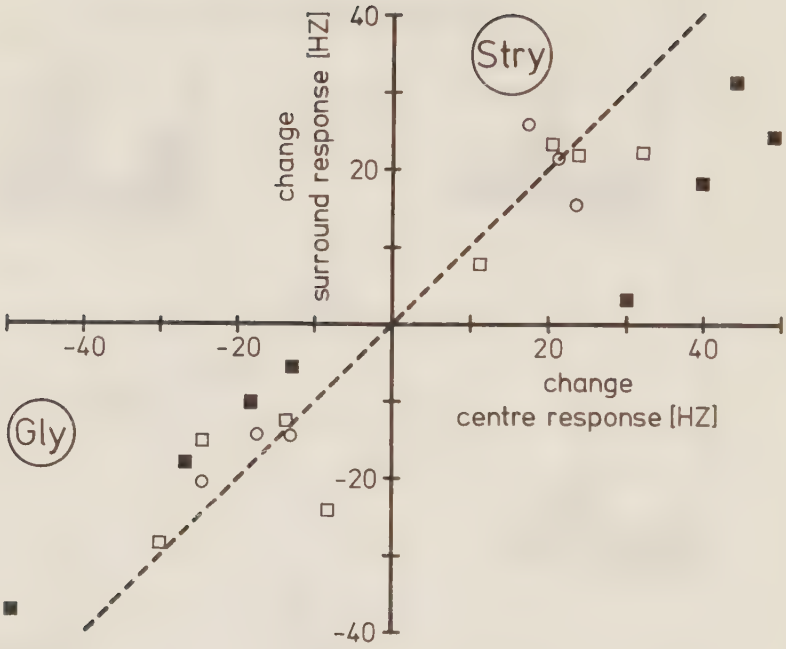

Abb. 21
Änderung der gemischten Zentrums/Umfeldantwort durch Glycin und Strychnin. Die absolute Änderung der Entladungsrate der Umfeldantwort wurde als Funktion der Änderung der Zentrumsantwort aufgetragen. Daten von 11 verschiedenen Zellen; (□) ON-Y-Zellen, (■) OFF-Y-Zellen, (○) ON-X-Zellen. Strychnin-induzierte Erhöhung der Antwort im rechten oberen Quadranten, Glycin-induzierte Unterdrückung im linken unteren Quadranten. Die Werte sind entlang der ersten Winkelhalbierenden gestreut, Zentrums- und Umfeldantwort werden also durch die Drogen gleich stark beeinflußt.

Das Umfeld übt einen inhibitorischen Einfluß auf den Zentrumsmechanismus aus, dies äußert sich in der verminderten Zentrumsantwort bei Lichtreizen, die größer als das rezeptive Feldzentrum sind. Ganglienzellen sind deshalb räumlich getuned, d.h. eine maximale Antwort wird mit Lichtreizen erzielt, die mit dem rezeptiven Feldzentrum kongruent sind. Dies ist in Abb. 22 illustriert, wo die Zellantwort als Funktion der Reizgröße aufgetragen ist. Unter Glycinapplikation wird die ganze Kurve nach unten und unter Strychnin nach oben verschoben. Die Umfeldinhibition wird also ebenso wie die exzitatorische Umfeldantwort von Glycin unterdrückt.

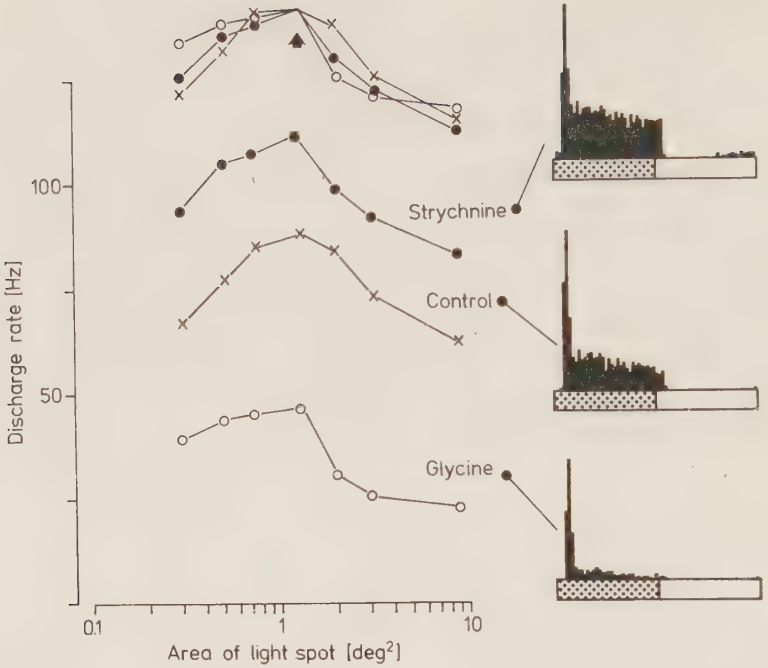

Abb. 22
Mittlere Entladung einer ON-X-Zelle als Funktion der Fläche des Reizpunktes. (x) Kontrollkurve, (○) während 10 nA Glycin-Applikation, (●) während 10 nA Strychnin-Applikation. Im oberen Inset wurden die Kurven superponiert, die Antwort auf den optimalen Lichtpunkt (▲) wurde als Referenz gewählt. Die PSTH's (rechts) zeigen die Antwort auf den optimalen Lichtpunkt bei Strychnin und Glycin-Applikation sowie die drogenfreie Kontrollmessung. Reiz 15.5 cd/m²; Hintergrund 5 cd/m².

3.4. Diskussion

3.4.1 Die umgekehrte APB-Antwort

In der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, daß APB ON- und OFF-Zentrumszellen entgegengesetzt beeinflußt. Unter APB wird die Spontanaktivität von ON-Zellen erniedrigt und die von OFF-Zellen erhöht. Darüberhinaus wird die Lichtantwort von ON-Zellen unterdrückt, während sich die Antwort von OFF-Zellen nur wenig ändert. Jedoch reagierten 23% (n= 73) der Zellen eine zeitlang umgekehrt auf APB: ON-Zellen wurden erregt und OFF-Zellen wurden inhibiert. Diese umgekehrte APB-Antwort war langsamer als die normale APB-Antwort und es dauerte länger bis die Zellen das Ausgangsniveau wieder erreichten.

Eine Reihe möglicher Erklärungen für die umgekehrte APB-Antwort können ausgeschlossen werden. Die umgekehrte APB-Antwort ist kein Stromeffekt, da sie bei kleinen Iontophorese-Strömen (5 nA) und auch mit strombalancierten Elektroden auftrat. Die umgekehrte APB-Antwort scheint auch nicht auf begrenzte Diffusion der Drogen von der Elektrode zurückzuführen sein: Laterale Diffusion überdeckt das ganze rezeptive Feld von Y Zellen (Abb. 8) und umgekehrte APB-Antworten traten auch bei X-Zellen auf, die ein viel kleineres rezeptives Feld haben. Auch ist keine Diffusionsbarriere zwischen der inneren und äußeren Retina bekannt. Der Übergang von der normalen zur umgekehrten APB Antwort kann ebenfalls nicht dem Gleichgewichtspotential eines

Ionenkanals zugeschrieben werden, der von APB beeinflußt wird. In diesem Falle würde nämlich die umgekehrte APB-Antwort von einer Hyper- oder Depolarisation der Ganglienzelle oder einer vorgeschalteten Zelle abhängig sein und dies müßte wiederum mit einer Veränderung der Spontanaktivität verbunden sein. Es konnte jedoch keine konsistente Korrelation zwischen der Spontanaktivität und der umgekehrten APB-Antwort gefunden werden.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Ableittechnik eine pathologische Veränderung induziert, die zur umgekehrten APB-Antwort führt. Normalerweise zeigen Ganglienzellen nur eine kurze transiente Antwort auf Veränderung des Hintergrundlichtes; die langandauernde Veränderung der Spontanaktivität bei Zellen mit umgekehrter APB-Antwort könnte ein Hinweis sein, daß nicht nur die APB-Antwort abnormal ist. Dies müßte dann aber ein sehr lokaler Effekt sein, da das rezeptive Feld von Zellen mit umgekehrter APB-Antwort überlappend war mit normal antwortenden Ganglienzellen.

Es ist auch möglich, daß die Ganglienzellen zwei zueinander antagonistisch Typen von Rezeptoren für APB besitzen. Ein Rezeptor könnte dann die kurzanhaltende Unterdrückung oder Erhöhung der Entladung von ON- bzw. OFF-Zellen bewirken und der andere Rezeptor die längerandauernde entgegengesetzte Drogenantwort. Dieser langsame Mechanismus würde auch den beobachteten rebound erklären. Zusätzliche Evidenz für einen zweiten Mechanismus ist die transiente Erhöhung der Entladung

von ON-Zellen vor ihrer Unterdrückung durch APB (Abb. 10) und die leichte Unterdrückung von OFF-Zellen kurz vor der Erhöhung der Entladung (Abb. 13). Nach dieser Hypothese ist der Übergang von der normalen zur umgekehrten Drogenantwort auf eine Störung der Balance zweier antagonistischer Mechanismen zurückzuführen.

Schließlich ist auch eine pharmakologische Erklärung der umgekehrten APB-Antwort denkbar. Es gibt zahlreiche Hinweise, die dafür sprechen, daß Neurotransmitter neben ihren postsynaptischen Rezeptoren auch präsynaptische Rezeptoren besitzen. Diese Autorezeptoren regulieren über ein negatives Feedback-System die Synthese und Freisetzung des Transmitters; dieser Mechanismus ist deshalb langsamer als der direkte postsynaptische Effekt (Aghajanian und Bunny, 1973). Dies entspricht der umgekehrten APB-Antwort, die ebenfalls beträchtlich langsamer war als die normale Drogenantwort. Es ist deshalb möglich, daß Autorezeptoren bei der umgekehrten APB-Antwort beteiligt sind. Bis jetzt gibt es allerdings noch keine Hinweise auf Autorezeptoren für exzitatorische Aminosäuren. Es gibt jedoch Evidenzen für postsynaptische Rezeptoren für Glutamat, die außerhalb der synaptischen Membran über den ganzen Zellkörper verteilt sind und eine Hyperpolarisation der Zelle bewirken (Cull-Candy und Usherwood, 1973; Cotman und Landhorn, 1981). Diese Hyperpolarisation hat einen langsameren Zeitverlauf als die Depolarisation über die konventionellen Rezeptoren. In einer Studie an Horizontalzellen in der Kaninchenretina wurde gezeigt, daß bei einer niederen Konzentration eines strukturellen Analogons von Aspartat 65% der Zellen hyperpolarisiert, und die restlichen depolarisiert werden (Bloomfield und Dowling, 1982).

Es könnte also sein, daß die umgekehrte APB-Antwort auf Rezeptoren außerhalb der postsynaptischen Membran zurückzuführen ist. Der Grund für die wechselnde Dominanz dieser beiden Rezeptortypen ist allerdings nicht klar.

3.4.2 Blockiert APB die ON-Antwort in der Retina?

Slaughter und Miller (1981) konnten in der Necturus-Retina zeigen, daß APB die Lichtantwort von ON-Bipolarzellen blockiert und dadurch die ON-Antworten von nachgeschalteten Zellen ausfallen. Dagegen fanden sie keinen Einfluß von APB auf OFF-Bipolarzellen und OFF-Antworten von anderen retinalen Neuronen. Ähnliche Ergebnisse wurden an der Fischretina erzielt (Shiells et al., 1981). Bei Ableitungen aus der isolierten Retina vom Kaninchen wurde gefunden, daß nach Applikation von APB in der Badlösung die ON-Antworten reduziert werden (Ganong und Cottman, 1982). Bei Ableitungen im Geniculatum des Affen (Schiller, 1982) und der Katze (Horton und Sherk, 1983) wurde eine Unterdrückung von ON-Zellen nach retinaler APB-Infusion gefunden. In der vorliegenden iontophoretischen Studie an der Katzenretina wurde ebenfalls gezeigt, daß APB die Lichtantwort und die Spontanaktivität von ON-Ganglienzellen unterdrückt. Die genaue synaptische Wirkung von APB ist jedoch in der Säugerretina noch nicht bekannt. Es gibt Hinweise aus histologischen Studien, die zeigen, daß Aspartat von Photorezeptoren und Ganglienzellen in der Kaninchenretina aufgenommen wird (Ehinger, 1981). AAT, ein Schlüsselenzym im Metabolismus von Aspartat und Glutamat, kann immunohistochemisch

in Photorezeptoren und Ganglienzellen bei der Ratte (Recasens und Delannay, 1981) und bei der Katze (s. Abschnitt 2.3.1) nachgewiesen werden. Aspartat und Glutamat sind also der mögliche Photorezeptor-Transmitter in diesen Spezies. Es liegt also nahe, eine ähnliche Wirkung von APB in der äußeren Retina zu postulieren wie es für die Necturus -Retina beschrieben wurde. Wenn aber APB auch bei Säugern selektiv die Antwort von ON-Bipolarzellen unterdrückt, wie ist dann der Einfluß von APB auf OFF-Ganglienzellen zu erklären?

Aufgrund anatomischer Studien schlug Sterling (1983) vor, daß der Eingang auf Ganglienzellen nach einem 'push-pull' Mechanismus organisiert ist. Danach erhalten ON-Ganglienzellen zusammen mit einem exzitatorischen Eingang von ON-Bipolarzellen einen inhibitorischen Eingang von OFF-Bipolarzellen. Somit wird eine ON-Ganglienzelle bei einem intermittierenden Lichtreiz während Licht-an erregt ('push') und bei Licht-aus aktiv inhibiert ('pull'), das Ergebnis dieser Operation ist eine zeitliche Kontrastverschärfung. Der Eingang auf OFF-Ganglienzellen ist entsprechend organisiert (Abb. 23). Wenn APB den Eingang von ON-Bipolarzellen auf ON-Ganglienzellen blockiert, bleibt gemäß dem push-pull-Modell ein inhibitorischer Eingang von OFF-Bipolarzellen bestehen, der die Ganglienzellantwort unterdrückt.Das push-pull-Modell sagt aber auch einen Einfluß von APB auf OFF-Ganglienzellen voraus: APB blockiert den inhibitorischen Eingang von ON-Bipolarzellen auf OFF-Ganglienzellen, diese Disinhibition sollte zu einer Erhöhung der Spontanaktivität von OFF-Ganglienzellen führen. Dies ist in Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen.

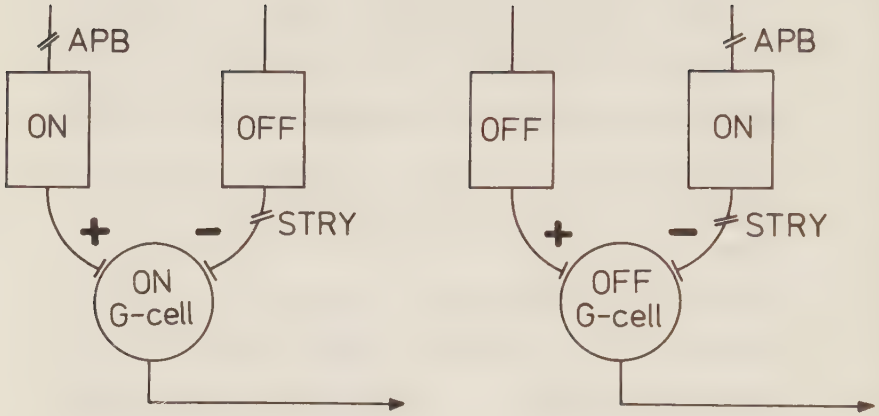

Abb. 23
Push-Pull-Modell nach Sterling (1983), Erklärung im Text. Die Abbildung illustriert die Spekulation, daß APB den ON-Kanal und Strychnin den Pull-Mechanismus blockiert. Entsprechend den Ergebnissen aus den histologischen Untersuchungen (Abschnitt 2) ist eine synaptische Wirkung von APB in der äußeren und von Strychnin in der inneren Retina zu vermuten.

Der Einfluß von APB auf die Lichtantwort von OFF-Ganglienzellen ist weniger klar vorauszusagen. Wenn bei einem Dunkelreiz OFF-Ganglienzellen durch OFF-Bipolarzellen erregt werden,fällt entweder die Inhibition von ON-Bipolarzellen völlig aus wegfallen oder eine Restinhibition bleibt bestehen. APB sollte deshalb entweder keinen Effekt auf die Lichtantwort von OFF-Ganglienzellen haben oder zu einer geringen Erhöhung führen. Tatsächlich hatte APB keinen konsistenten Einfluß auf die Lichtantwort, in einigen Fällen wurde die Lichtantwort sogar leicht reduziert (Abb. 12).

Der reziproke Einfluß von APB auf ON- und OFF-Ganglienzellen war unabhängig davon, ob die Ganglienzellen zur X- oder Y-Klasse gehörten. Vermutlich haben also beide Zellklassen einen gemeinsamen Eingang von Bipolarzellen und beide sind gemäß dem push-pull Modell organisiert. Die charakteristischen Eigenschaften von X- und Y-Zellen resultieren dann aus spezifischen Verschaltungen mit nachgeschalteten Amakrinzellen in der inneren Retina.

3.4.3 Implikationen für den Mechanismus der Umfeldantwort

Umfeldantworten sind antagonistisch zu Zentrumsantworten: bei ON-Ganglienzellen führt die Stimulation des Umfelds zu einer OFF-Antwort und bei OFF-Ganglienzellen zu einer ON-Antwort. Unter der Voraussetzung, daß APB den ON-Kanal blockiert, kann aus der Wirkung von APB auf die Umfeld- antwort abgeleitet werden, wie diese Antwort gebildet wird.

Die räumliche Ausdehnung des Umfeldes ist größer als die des rezeptiven Feldzentrums und damit größer als der Dendritenbaum der Ganglienzelle. Deshalb ist eine laterale Interaktion für die Umfeldantwort erforderlich, entweder in der OPL über Horizontalzellen oder in der IPL über Amakrinzellen. Wenn die Umfeldantwort in der äußeren Retina generiert werden würde, so müßten auch die Bipolarzellen konzentrisch organisiert sein: einige Bipolarzellen in der Katzenretina weisen eine Umfeldantwort auf, andere dagegen nicht (Nelson et al., 1981), die Frage ist also offen.

Wird die Umfeldantwort der Ganglienzellen in der inneren Retina über Amakrinzellen gebildet, so sind zwei Mechanismen denkbar. Die Umfeldantwort von ON-Ganglienzellen kann über Vorzeichen erhaltende Amakrinzellen mit Eingang von OFF-Bipolarzellen vermittelt oder aber über Vorzeichen umkehrende Amakrinzellen mit Eingang von ON-Bipolarzellen (ähnlich bei OFF-Ganglienzellen).

Mit Vorzeichen erhaltenden Amakrinzellen sollte APB die Umfeldantwort von OFF-Ganglienzellen unterdrücken. Tatsächlich unterdrückt aber APB die Umfeldantwort von ON-Ganglienzellen, während die Umfeldantwort von OFF-Ganglienzellen erhalten bleibt. Die Ergebnisse sind also mit dem 2. Modell konsistent, nachdem die Umfeldantwort über Bipolarzellen mit Vorzeichen umkehrenden Amakrinzellen gebildet wird. Es ist denkbar, daß auch die Umfeldantwort gemäß dem push-pull Modell aufgebaut ist, dies würde dann die Ergebnisse bei den OFF-Ganglienzellen erklären (Abb. 14).

3.4.4 Glycinerge Inhibition in der Retina

In den Abschnitten 3.3.5 und 3.3.6 wurde gezeigt, daß Glycin einen starken inhibitorischen Einfluß auf alle X- und Y-Zellen ausübt. Glycin unterdrückt die Spontanaktivität und die spezifische Lichtantwort, wobei die tonische Antwort stärker als die phasische Antwort beeinflußt wird. Dieser differentielle Effekt von Glycin ist ein zusätzlicher Hinweis darauf, daß die Glycin-induzierte Unterdrückung der Lichtantwort nicht allein auf die verminderte Spontanaktivität zurückzuführen ist. Strychnin hat genau die entgegengesetzte Wirkung wie Glycin: Strychnin erhöht die Spontanaktivität und die Lichtantwort, wobei wieder die tonische Entladung stärker als die phasische Entladung beeinflußt wird. Somit ist auch in der Retina die Wirkung von Strychnin antagonistisch zu Glycin.

Der Zeitverlauf des Abklingens der Drogenantwort war zwischen Glycin und Strychnin unterschiedlich. Die Ganglienzellen erreichten ihr Ausgangsniveau 2-10 Sek. nach Abschalten des Glycinstromes, während die Zellen bis zu 10 Min. benötigten, um sich von der Strychnin-Applikation zu erholen. Die schnelle Beendigung der Glycinantwort ist auf das hochaffine Transportsystem für Glycin in der Retina zurückzuführen (Bruun und Ehinger, 1972; Chin und Lam, 1980), aufgrund dessen die glycinergen Neurone in der Katzenretina markiert werden konnten (s. Abschnitt 2.3.4). Ein solches Aufnahmesystem existiert aber nicht für Strychnin, diese Droge wird durch eine länger andauernde passive Diffusion aus dem synaptischen Spalt entfernt.

Die meisten früheren Untersuchungen über glycinerge Inhibition in der Säugerretina wurden mit systemisch appliziertem Strychnin ausgeführt (s. Abschnitt 3.1). Diese Art der Strychnin-Applikation führte immer zu einer anhaltenden Gruppenentladung von Ganglienzellen, die bei iontophoretisch appliziertem Strychnin nie beobachtet wurde. Es ist nicht klar, ob diese Gruppenentladungen auf systemische Nebenwirkungen oder auf ein weitreichendes Netzwerk von glycinergen Zellen zurückzuführen ist, die durch die lokal wirkende Iontophorese nicht beeinflußt werden. Es ist deshalb schwierig, diese Experimente mit den hier beschriebenen iontophoretischen Daten zu korrelieren.

Kürzlich berichteten jedoch Ikeda und Sheardown (1983), daß kontophoretisch appliziertes Glycin OFF-Ganglienzellen in der Katzenretin inhibiert und Strychnin die Antwort erhöht, daß aber ON-Ganglienzellen von den Drogen nicht beeinflußt werden. Dies steht in direktem Gegensatz zu der vorliegenden Studie, in der keine unterschiedliche Drogenantwort zwischen ON- und OFF-Ganglienzellen gefunden wurde. Bei Ikeda und Sheardown (1983) waren die Drogenkonzentration, der pH-Wert und die Iontophoreseströme im selben Bereich wie hier beschrieben und die Ganglienzellen wurden unter ähnlichen Reizbedingungen getestet. Während aber in unserer Studie Axonableitungen eindeutig erkannt und ausgeschlossen wurden (s. Abschnitt 3.2.4) war dies bei Ikeda und Sheardown (1983) nicht der Fall. Möglicherweise wurden einige ihrer ON-Zellen vom Axon anstelle vom Zellkörper oder den Dendriten abgeleitet und deshalb von den

Drogen nicht beeinflußt. Es scheint jedoch unwahrscheinlich, daß sämtliche ON-Zellen von Axonen abgeleitet worden sind. Es ist deshalb unklar, weshalb Ikeda und Sheardown (1983) die hier beschriebene Glycin-induzierte Inhibition von ON-Ganglienzellen nicht beobachten konnten.

Welche funktionelle Bedeutung könnte die Glycin-induzierte Inhibition in der Retina haben? Glycin scheint an der antagonistischen Organisation des rezeptiven Feldes nicht beteiligt zu sein, da Zentrums- und Umfeldantwort von Glycin in gleicher Weise beeinflußt werden. Da sich die Form der Flächenantwort-Funktion (Abb. 22) unter Glycin und Strychnin nicht änderte, scheint die glycinerge Inhibition auch nicht an der räumlichen Organisation des rezeptiven Feldes beteiligt zu sein.

Gemäß dem in Abschnitt 3.4.2 vorgestellten push-pull-Modell erhalten sowohl ON- als auch OFF-Ganglienzellen einen substantiellen inhibitorischen Eingang. Phänomenologisch zeigt iontophoretisch appliziertes Glycin eine solche Inhibition auf die Ganglienzellaktivität. Blockiert also Strychnin den pull-Mechanismus in der Retina (vergl. Abb. 23)? Wenn diese Spekulation stimmt, dann müßte es glycinerge ON- und OFF-Neurone präsynaptisch zu Ganglienzellen geben. Es ist bekannt, daß es glycin-akkumulierende Bipolarzellen gibt (McGuire et al., 1980), genausogut könnten aber den Bipolarzellen nachgeschaltete Amakrinzellen diese postulierten glycinergen Neurone sein. Um diese Fragen zu beantworten, ist eine pharmakologische Untersuchung von Neuronen präsynaptisch zu Ganglienzellen notwendig.

4. Neuropeptide

4.1 Einleitung

In den letzten 10 Jahren wurden über 30 verschiedene Peptide in Neuronen von Säugern nachgewiesen. Diese Neuropeptide werden durch einen Calcium-abhängigen Sekretionsprozeß freigesetzt und es gibt eine Reihe von Evidenzen die zeigt, daß Peptide als chemische Transmitter im zentralen Nervensystem fungieren (Iverson, 1983). Somit ist quasi über Nacht die Zahl der möglichen Transmitterkandidaten im Nervensystem von Säugern von etwa 10 Monoaminen und Aminosäuren auf über 40 angestiegen.

Nahezu alle bekannten Neuropeptide konnten auch in der Retina lokalisiert werden (Übersichtsarbeiten: Brecha, 1983; Karten und Brecha, 1983). Im Gegensatz zu der Vielzahl von histologischen Arbeiten über die Lokalisation von Neuropeptiden in der Retina, gibt es nur sehr wenige physiologische Untersuchungen. In der Retina von Kaltblütlern konnte eine Wirkung von Substanz P (Dick und Miller, 1981; Glickman et al., 1982) und Enkephalinen (Djamgoz et al., 1981) auf die Ganglienzellaktivität nachgewiesen werden. Es gibt bis jetzt jedoch noch keine Hinweise auf die funktionelle Bedeutung von Neuropeptiden in der Retina.

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit dem Einfluß von Thyreotropin-Freisetzung-Hormon (TRH) auf die Ganglienzellaktivität in der Katzenretina. TRH war das erste

hypothalamische Hormon, das isoliert und chemisch identifiziert werden konnte (Guillemin, 1978). Im Hypothalamus der Ratte befinden sich jedoch nur 20% der TRH-Menge des Gehirns. Hökfelt et al. (1975) konnten mit immunohistochemischen Methoden TRH-positive Fasern in verschiedenen Hirnregionen und im Rückenmark nachweisen. In physiologischen Untersuchungen wurde gezeigt, daß TRH die Entladungsrate von Neuronen im Rückenmark (Nicoll, 1977) und in verschiedenen Gehirnregionen (Renaud et al., 1975) beeinflußt. TRH konnte auch in der Retina von verschiedenen Vertebraten biochemisch nachgewiesen werden (Scheffer et al., 1977; Eskay et al., 1980). Im Folgenden wird gezeigt, daß TRH eine spezifische Rolle in der Signalverarbeitung der Katzenretina spielt.

4.2. Methodik

Die Technik der intraokularen Iontophorese ist in Abschnitt 3.2. schon beschrieben worden. TRH (50 mM; Sigma), wurde in Wasser gelöst Serotonin (0.04 M; Sigma) in 0.1%iger Ascorbinsäure und mit NaOH auf pH 6 eingestellt.

4.3. Ergebnisse

4.3.1 Wirkung von TRH auf ON- und OFF-Zellen

Unter photopischen Reizlicht-Bedingungen hatte TRH eine differenzielle Wirkung auf ON- und OFF-Ganglienzellen, unabhängig von der X/Y-Klassifikation. Abb. 24 a zeigt die Antwort einer ON-X-Zelle auf das Einschalten eines Lichtpunktes in ihrem rezeptiven Feldzentrum. Applikation von TRH führt zu einer deutlichen Unterdrückung der Zellantwort. Die OFF-X-Zelle in Abb. 24 b wird durch das Ausschalten eines Lichtpunktes in ihrem rezeptiven Feldzentrum erregt, iontophoretisch appliziertes TRH verursacht eine deutliche Erhöhung der Zellentladung. Die TRH-Effekte waren völlig reversibel und der Zeitverlauf war ähnlich wie bei den klassischen Transmittersubstanzen (s. Abschnitt 3).

Die Spontanaktivität bei homogenem photopischem Hintergrund wurde durch TRH auf dieselbe Weise beeinflußt wie die Lichtantwort. TRH unterdrückte die Spontanaktivität von ON-Zellen und erhöhte die Spontanaktivität von OFF-Zellen. Die Drogen-induzierte Veränderung der Lichtantwort war jedoch nicht ausschließlich auf die veränderte Spontanaktivität zurückzuführen. Während TRH-Applikation wurde auch die spezifische Lichtantwort (s. Abschnitt 3.2.3) von ON-Zellen im Mittel auf 34% unterdrückt (n=14) und die von OFF-Zellen auf 149% erhöht (n=23).

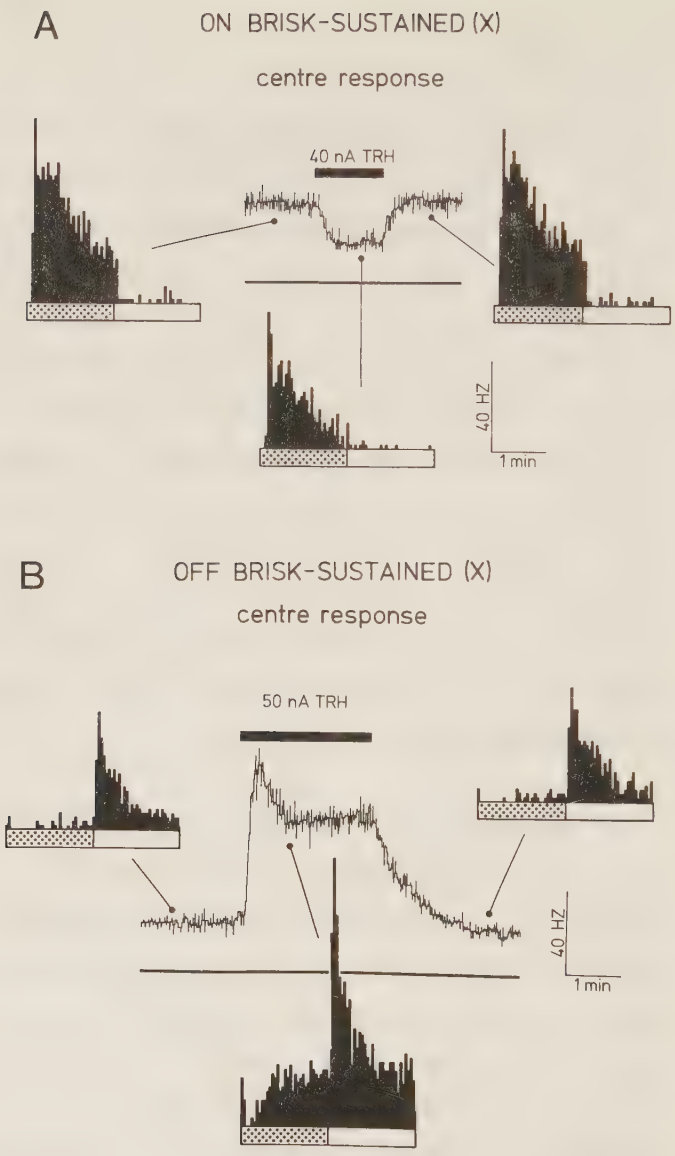

Abb. 24
Reziproke Modulation von ON- und OFF-Zellen durch TRH bei photopischer Beleuchtung. (A) TRH unterdrückt die Aktivität einer ON-X-Zelle. (B) TRH erhöht die Aktivität einer OFF-X-Zelle. Lichtpunkt 1.0° Durchmesser; Reiz 125 cd/m², Hintergrund 105 cd/m².

4.3.2 Wirkung von TRH bei scotopischer und photopischer Beleuchtung

Die im vorausgehenden Abschnitt beschriebene Wirkung von TRH auf die Ganglienzellaktivität wurde bei photopischem Hintergrund gemessen. Bei reduziertem Hintergrundslicht hatte TRH keinen Einfluß auf die Ganglienzellantwort. Dies ist in Abb. 25 für eine ON-X-Zelle illustriert. Während bei 320 cd/m² die Zelle durch TRH praktisch vollständig unterdrückt wurde, war bei 25 cd/m² die Drogenantwort schon merklich schwächer und bei 5 cd/m² hatte TRH keinen Einfluß mehr auf die Zellaktivität.

Wird bei konstantem Reizlicht die Hintergrundsbeleuchtung erhöht, so ändert sich der Kontrast des Reizes. Bei einer Reihe von Zellen wurde deshalb die TRH Antwort bei verschiedenem Hintergrund, aber gleichem Kontrast getestet. Abb. 26 zeigt eine solche Messung bei einer OFF-X-Zelle. Während bei Dunkeladaptation TRH keinen Einfluß auf die Zellaktivität besitzt, kommt es bei Erhöhung des Hintergrundlichtes zu einer Aktivitätssteigerung unter TRH. Die Wirkung von TRH hängt also direkt mit dem Hintergrundslicht zusammen und kann nicht auf den Stimulus-Kontrast zurückgeführt werden.

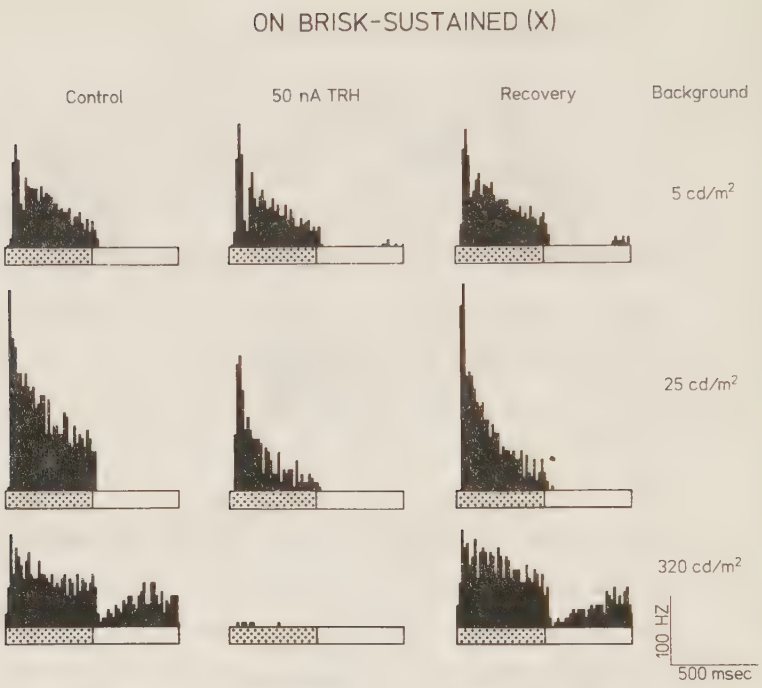

Abb. 25
Einfluß von TRH auf eine ON-X-Zelle bei verschiedener Hintergrundsbeleuchtung. Oberste Reihe: bei 5 cd/m² Hintergrund hat TRH keine Wirkung auf die Zellantwort (Reiz 15 cd/m²). Mittlere Reihe: bei 25 cd/m² wird die Zelle durch TRH deutlich unterdrückt (Reiz 50 cd/m²). Untere Reihe: bei 320 cd/m² Hintergrund ist die Zellaktivität vollständig unterdrückt (Reiz 340 cd/m²). Reizdurchmesser 1.3°.

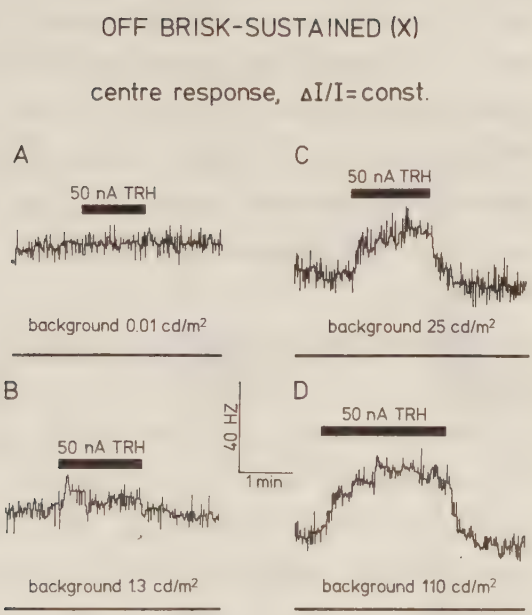

Abb. 26
Einfluß von TRH auf eine OFF-X-Zelle bei verschiedener Hintergrundsbeleuchtung. Die Zellantwort wurde bei konstantem Kontrast gemessen, d.h. daß Stimulusinkrement I wurde bei gegebenem Hintergrund I so gewählt, daß I/I = 0.20 war. Unter skotopischer Beleuchtung hatte TRH keine Wirkung auf die Ganglienzellaktivität, bei photopischer Beleuchtung wurde die Entladung der OFF-Zelle unter TRH erhöht. Reizpunkt 0.7° Durchmesser.

Die niedrigste Hintergrundsleuchtdichte, bei der noch eine TRH-Antwort erzielt werden konnte, war nicht exakt festzulegen, da die TRH-Antwort eine graduierte Funktion des Hintergrundes war. Eine merkbare TRH-Antwort war mit allen Zellen bei einer Hintergrundsleuchtdichte zwischen 5 - 20 cd/m² zu erzielen. Mit der hier verwendeten künstlichen Pupille von 4 mm Durchmesser entspricht dies dem mesopischen Bereich bei der Katze (Barlow und Levick, 1968; Enroth-Cugell, 1977).

4.3.3 Vergleich der Serotonin- und TRH-Antwort.

Thier und Wässle (1984) berichteten, daß Serotonin die gleiche reziproke Modulation von ON- und OFF-Ganglienzellen bewirkt wie hier für TRH bei photopischer Beleuchtung gefunden wurde: Serotonin unterdrückt die Aktivität von ON-Zellen und erhöht die Aktivität von OFF-Zellen. Da in den Versuchen von Thier und Wässle (1984) die Antwort von Serotonin nur bei mesopischer Stimulation gemessen wurde, war es von Interesse zu sehen, ob die Serotonin-Antwort in ähnlicher Weise von der Hintergrundsbeleuchtung abhängt wie die TRH-Antwort.

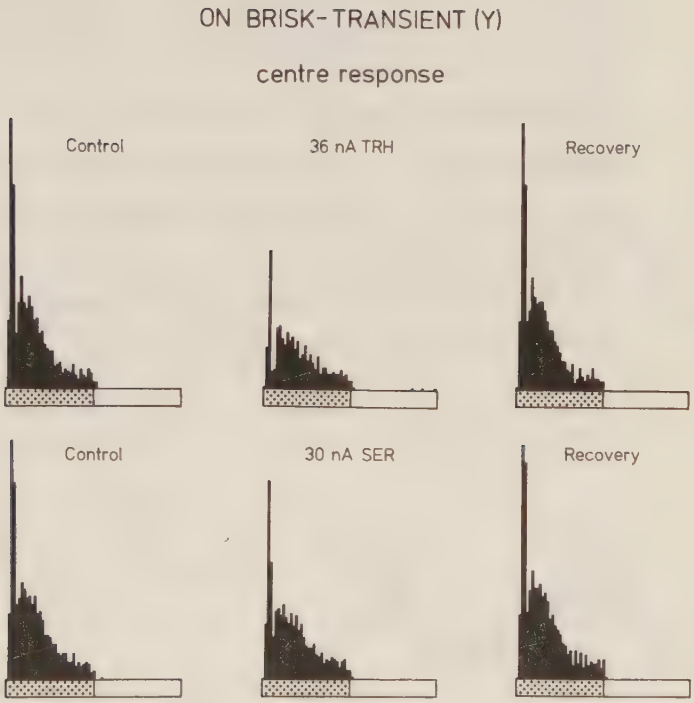

Abb. 27
Zentrumsantwort einer ON-Y-Zelle. Die Aktivität der Zelle wird sowohl durch TRH als auch durch Serotonin unterdrückt. Reizpunkt 2.5° Durchmesser; Hintergrund 15 cd/m², Reiz 35 cd/m².

Abb. 27 zeigt die photopische Zentrumsantwort einer ON-Y-Zelle. Mit iontophoretisch appliziertem Serotonin wurde eine vergleichbare Unterdrückung dieser ON-Zelle wie mit TRH erzielt. In Abb. 28 wurde die Antwort von Serotonin und TRH bei verschiedenem Hintergrundslicht getestet. Während die Antwort auf TRH wieder erst bei photopischer Beleuchtung einsetzte, wurde eine Serotonin-Antwort sowohl unter skotopischer wie unter photopischer Beleuchtung erzielt. Im Gegensatz zu TRH konnte also mit Serotonin keine Abhängigkeit der Drogenantwort von der Hintergrundsleuchtdichte festgestellt werden.

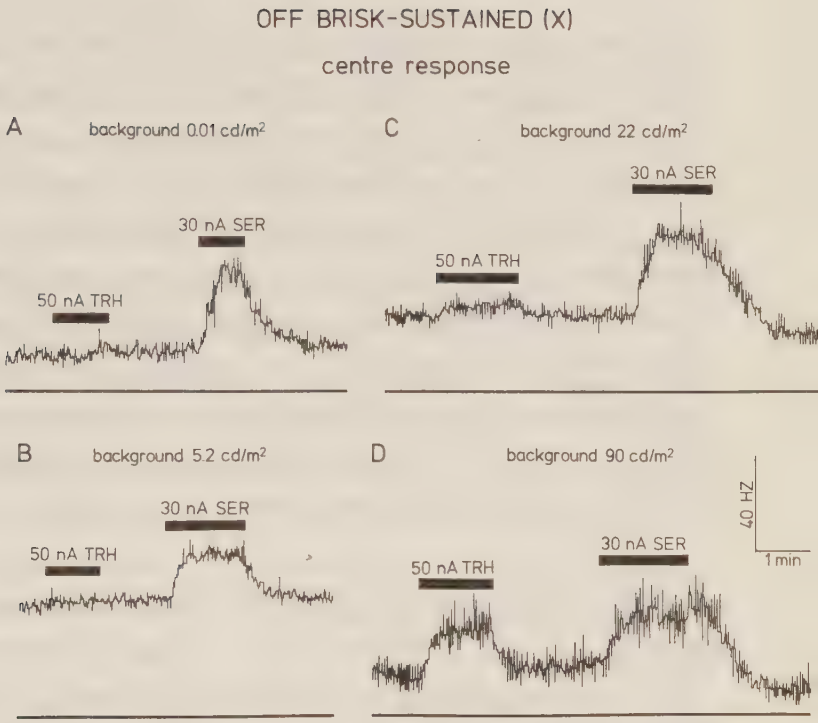

Abb. 28
Vergleich der Wirkung von TRH und Serotonin bei einer OFF-X-Zelle unter skotopischer und photopischer Reizung. Während TRH die Zellantwort nur bei photopischem Hintergrund beeinflußt, wirkt Serotonin sowohl bei skotopischer als auch bei photopischer Beleuchtung. Lichtpunkt 0.85° Durchmesser; Stimulusinkrement in (A) 0.01 cd/m² und in (B-D) 20 cd/m².

4.4 Diskussion

Die vorliegende Untersuchung legt eine Transmitterfunktion von TRH in der Katzenretina nahe. TRH kann nicht direkt auf die Ganglienzellen wirken, da unter skotopischer Beleuchtung exogen appliziertes TRH die Ganglienzellaktivität nicht beeinflußt hatte. Man muß deshalb fordern, daß TRH auf Neurone wirkt, die präsynaptisch zu Ganglienzellen sind. Diese Neurone sind an der photopischen Signalverarbeitung in der Retina beteiligt. Da bei Dunkeladaptation iontophoretisch appliziertes TRH die Ganglienzellantwort nicht beeinflußte, müssen die TRH-sensitiven Interneurone entweder im Dunkeln völlig stumm sein, oder aber von im Dunkel aktiven skotopischen Neuronen inhibiert werden.

Serotonin induzierte dieselbe reziproke Modulation von ON- und OFF-Zellen wie TRH, im Gegensatz zu TRH war jedoch die Wirkung von Serotonin unabhängig von der Hintergrundsbeleuchtung. Eine direkte Wirkung von Serotonin auf Ganglienzellen kann also nicht ausgeschlossen werden. Tatsächlich fand Homgren-Taylor (1982) eine direkte synaptische Verbindung von Indolamin-akkumulierenden Neuronen mit Ganglienzellen in der Katzenretina. Die meisten synaptischen Kontakte hatten die Indolamin-akkumulierenden Neurone jedoch mit den Stäbchen-Bipolarzellen. Vermutlich ist also bei normaler retinaler Verarbeitung Serotonin am skotopischen Sehen beteiligt ,während exogen appliziertes Serotonin die Ganglienzellantwort auch unter photopischen Bedingungen weiterhin beeinflußt. Es ist also denkbar, daß in der Retina ein klassischer Transmitter und ein Neuropeptid dieselbe spezifische Funktion bei skotopischer bzw. photopischer Beleuchtung teilen.

Was könnte nun die funktionelle Bedeutung dieser reziproken Modulation von ON- und OFF-Ganglienzellen durch TRH und Serotonin sein? Die Spontanaktivität von Ganglienzellen ist weitgehend unabhängig von der Hintergrundsbeleuchtung (Barlow und Levick, 1969; Sakmann und Creutzfeldt, 1969). Ohne Adaptationskontrolle würde eine Erhöhung des Hintergrundlichtes zu einem Anstieg der Spontanaktivität von ON-Zellen und zu einem Abfall der Spontanaktivität von OFF-Zellen führen. Ein Adaptationskontrollsystem wirkt diesen Änderungen der Spontanaktivität entgegen. Phenomenologisch ist dieser Mechanismus mit der Wirkung von iontophoretisch appliziertem TRH und Serotonin identisch. Sind also TRH und Serotonin Teil desselben Kontrollsystems und ergänzen sich gegenseitig, wobei TRH bei der Adaptation im photopischen und Serotonin bei der im skotopischen Bereich beteiligt ist? Die pharmakologischen Grundlagen der Adaptation bedarf einer weiteren Analyse. Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß Neuropeptide eine definierte Rolle in der Retina spielen können und bei der retinalen Signalverarbeitung in Betracht gezogen werden müssen.

5. Literaturverzeichnis

Adrian, E.D. and Matthews, R. (1928). The action of light on the eye. Part III. The interaction of retinal neurones. J. Physiol. 65, 273-298.

Aghajanian, G.K. and Bunny, B.S. (1973). Central dopaminergic neurons: neurophysiological identification and responses to drugs. In: Frontiers in Catecholamine Research (eds. Usdin E. & Snyder S.H.) pp. 643-648. Pergamon Press, New York.

Altschuler, R.A., Mosinger, J.L., Harmison, G.G, Parakkal, M.H. and Wenthold, R.J. (1982) Aspartate aminotransferase-like immunoreactivity as a marker for aspartate/glutamate in guinea pig photoreceptors. Nature 298, 657-659.

Altschuler, R.A., Neises, G.R., Harmison, G.G., Wenthold, R.J. and Fex, J. (1981). PNAS. 78, 1255-1259.

Aprison, M.H., Shank, R.P., Davidoff, R.A. and Werman, R. (1968). The distribution of glycine, a neurotransmitter suspect, in the central nervous system of several vertebrate species. Life Sci. 7, 583-590.

Barlow, H.B. and Levick, W.R. (1968). The Purkinje shift in the cat retina. J. Physiol. 196, 2-3.

Bloom, F.E. (1974) To spritz or not to spritz: the doubtful value of aimless iontophoresis. Life Sciences 14, 1819-1834.

Boycott, B.B. and Wässle, H. (1974) The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. J. Physiol. 240, 397-419.

Brecha, N., Karten, H.J. and Schenker, C. (1981) Neurotensin-like and somatostatin-like immunoreactivity within amacrine cells of the retina. Neurosci. 6, 1329-1340.

Brecha, N. (1983) Retinal neurotransmitters: Histochemical and biochemical studies. Chemical Neuroanatomy (C.Emson ed.), Raven Press, New York, pp. 85-129.

Bruun, A. and Ehinger, B. (1972) Uptake of the putative neurotransmitter, glycine, into the rabbit retina. Invest. Ophthal. 11, 191-198.

Chin, Ch,-A. and Lam, D.M.-K. (1980) The uptake and release of (^{3}H)glycine in the goldfish retina. J. Physiol. 308, 185-195.

Chu, S. (1968) Strychnine-sensitive and -insensitive inhibitions in cat's retina. Tohoku J. exp. Med. 96, 37-43.

Cleland, B.G. and Levick, W.R. (1974 a) Brisk and sluggish concentrically organized ganglion cells in the cat's retina. J. Physiol. 240, 421-456.

Cleland, B.G. and Levick, W.R. (1974 b) Properties of rarely encountered types of ganglion cells in the cat's retina and an overall classification. J. Physiol. 240, 457-492.

Cleland, B.G., Dubin, M.W. and Levick, W.R. (1971) Sustained and transient neurones in the cat's retina and lateral geniculate nucleus. J. Physiol. 217, 473-496.

Cleland, B.G., Levick, W.R. and Sanderson, K.J. (1973) Properties of sustained and transient ganglion cells in the cat retina. J. Physiol. 228, 649-680.

Cohen, L.H. and Noell, W.K. (1965) Relationships between visual function and metabolism. In C.N. Graymore (ed): Biochemistry of the retina. London and New York: Academic Press, pp. 36-49.

Cotman C.W., Foster, A. and Lanthorn, T. (1981) An overview of glutamate as a neurotransmitter. In: Glutamate as Neurotransmitter (eds. DiChiara G, and Gessa, E.L.) Raven Press, New York.

Cull-Candy, S.G. and Usherwood, P.N.R. (1973) Two populations of L-glutamate receptors on locust muscle fibres. Nature New Biol. 246, 62-64.

Curtis, D.R., Hösli, L., Johnston, G.A.R. and Johnston, I.H. (1968) The hyperpolarization of spinal motoneurones by glycine and related amino acids. Exp. Brain Res. 5, 235-258.

Curtis, D.R., Phillis, J.W. and Watkins, J.C. (1960) the chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. J. Physiol. 150, 656-682.

Dick, E. and Miller, R.F. (1981) Peptides influence retinal ganglion cells. Neurosci. Letters 26, 131-135.

Djamgoz, M.B.A., Stell, W.K.; Chin, Ch.-A. and Lam, D.M.K. (1981) An opiate system in the goldfish retina. Nature 292, 620-623.

Ehinger, B. (1981) Cells accumulating ^{3}H-glycine in the goldfish retina. Albrecht von Gräfes Arch. Klin. Ophthalmol. 217, 1-7.

Ehinger, B. and Falck, B. (1971) Autoradiography of some suspected neurotransmitter substances: GABA, glycine, glutamic acid, histamine, dopamine, and L-DOPA. Brain Res. 33, 157-172.

Ehinger, B. and Lindberg, B. (1974) Light-evoked release of glycine from the retina. Nature 251, 727-728.

Ehinger, B. and Lindberg-Bauer, B. (1976) Light-evoked release of glycine from cat and rabbit retina. Brain Res. 113, 535-549.

Enroth-Cugell, C. and robson, J.G. (1966) The contrast sensitivity of retinal ganglion cells of the cat. J. Physiol. 187, 517-552.

Enroth-Cugell, C., Hertz, B.G. and Lennie, P. (1977) Cone signals in the cat's retina. J. Physiol. 269, 273-296.

Eskay, R.L.; Long, R.T. and Iuvone, P.M. (1980) Evidence that TRG, somatostatin and substance P are present in neurosecretory elements of the vertebrate retina. Brain Res. 196, 554-559.

Ganong, A.H. and Cotman, C.W. (1982) Acidic amino acid antagonists of lateral peforant path synaptic transmission: agonist-antagonist interactions in the dentate gyrus. Neurosci. Letters 34, 195-200.

Glickman, R.D., Adolph, A.R. and Dowling, J.E. (1982) Inner plexiform circuits in the carp retina: effects of cholinergic agonists, GABA, and substance P on the ganglion cells. Brain Res. 234, 81-99.

Guillemin, R. (1978) Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. Science 202, 390-402.

Hammond, P. (1978) Inadequacy of nitrous oxide/oxygen mixtures for maintaining anaesthesia in cats: satisfactory alternatives. Pain 5, 143-151.

Heiss, W.-D. (1967) Daueraktivität retinaler Neurone unter Einwirkung von Strychnin und Pikrotoxin. Vision Res. 7, 583-598.

Heiss, W.-D. und Bornschein, H. (1965) Die Impulsverteilung der Daueraktivität von Einzelfasern des N. opticus. Pflügers Archiv 286, 1-18.

Hendrickson, A.E., Hunt, S.P. and Wu, J.-Y. (1981) Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in monkey striate cortex. Nature 292, 605-607.

Hökfelt, T., fuxe, K., Johansson, O., Jeffcoate, S. and White, N. (1975) Thyrotropin releasing hormone (TRH)-containing nerve terminals in certain brain stem nuclei and in the spinal cord. Neurosci. Letters 1, 133-139.

Hösli, L. and Hösli, E. (1972) Autoradiographic localization of the uptake of glycine in cultures of rat medulla oblongata. Brain Res. 45, 612-616.

Horton, J.C. and Sherk, H. (1983) Receptive-field properties in the cat's lateral geniculate nucleus in the absence of ON-center retinal input. (submitted)

Hughes, A. (1981) Population magnitudes and distribution of the major modal classes of cat retinal ganglion cells as estimated from HRP filling and a systematic surves of the soma diamter spectra for classical neurons. J. comp. Neurol. 197, 303-339.

Hughes, A. and Wieniawa-Narkiewicz, E. (1980) A newly identified population of presumptive microneurones in the cat retinal ganglion cell layer. Nature 284, 468-470.

Ikeda, H. and Sheardown, M.J. (1983) Transmitters mediating inhibition of ganglion cells in the cat retina: iontophoretic studies in vivo. Neuroscience 8, 837-853.

Iversen, L.L. (1983) Neuropeptides - what next? Trends in Neurosci. 6, 293-294.

Iversen, L.L., Mitchell, J.F. and Srinivasan, V. (1971) The release of -aminobutyric acid during inhibition in the cat visual cortex, J. Physiol. 212, 519-534.

Johnson, J.L. (1972) Glutamic acid as a synaptic transmitter in the nervous: A revie. Brain Res. 37, 1-19.

Johnston, G.A.R. and Iversen, L.L. (1974) Glycine uptake in rat central nervous system slices and homogenates: evidence for different uptake systems in spinal cord and cerebral cortex. J. Neurochem. 23, 1239-1244.

Karten, H. and Brecha, N. (1983) Localization of neuroactive substances in the vertebrate retina: evidence for lamination in the inner plexiform layer. Vision Res. 23, 1197-1205.

Kirby, A.W. (1979) The effect of strychnine, bicuculline, and picrotoxin on X and Y cells in the cat retina. J. Gen. Physiol. 74, 71-84.

Kelly, J.S. and Krnjevic, K. (1969) The action of glycine on cortical neurones. Exp. Brain Res. 9, 155-163.

Kemp, J.A. and Sillito, A.M. (1982) the nature of the excitatory transmitter mediating X and Y cell inputs to the cat dorsal lateral geniculate nucleus. J. Physiol. 323, 377-391.

Krnjevic, K. (1974) Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. Physiol. Rev. 54, 418-540.

Lake, N., Marschall, J. and Voaden , M.J. (1978) High affinity uptake sites for taurine in the retina. Exp. Eye Res. 27, 713-718.

Levick, W.R. (1972) Another tungsten microelectrode. Med. & Biol. Eng. 10, 510-515.

Marc, R.E. and Lam, D.M.-K. (1981) Glycinergic pathways in the goldfish retina. J. Neurosci. 1, 152-165.

Marshall, J. and Voaden, M. (1974) An investigation of cells incorporating (^{3}H) GABA and (^{3}H) glycine in the isolated retina of the rat. Exp. Eye res. 18, 367-370.

McGuire, B.A., Stevens, K. and Sterling, P. (1980) Beta ganglion cells receive convergent input from 2 types of cone bipolar cells. soc. Neurosci. Abstr. 6, 347.

McLean, I.W. and Nakone, P.K. (1974) Periodate-lysine-paraformaldehyd fixative, a new fixative for immunoelectron microscopy. J. Histochem. Cytochem. 22, 1077-1083.

Nelson, R., Kolb, H., robinson, M.M. and Mariani, A.P. (1981) Neural circuitry of the cat retina: cone pathways to ganglion cells. Vision Res. 21, 1527-1536.

Nicoll, R.A. (1977) Excitatory action of TRH on spinal motoneurones. Nature 265, 242-243.

Oertel, W.H., Schmechel, D.E., Tappaz, M.L. and Kopin, I.J. (1981) Production of a specific antiserum to rat brain glutamic acid decarboxylase by injection of an antigen-antibody complex. Neuroscience 6, 2689-2700.

Peichl, L. and Wässle, H. (1979) Size, scatter and coverage of ganglion cell receptive field centres in the cat retina. J. Physiol. 291, 117-141.

Peichl, L. and Wässle, H. (1983) the structural correlate of the receptive field centre of alpha ganglion cells in the cat retina. J. Physiol. 341, 309-324.

Pourcho, R.G. (1980) Uptake of (^{3}H)glycine and (^{3}H)GABA by amacrine cells in the cat retina. Brain Res. 198, 333-346.

Rayborn, M.E., Sarthy, P.V., Lam, D.M.K. and Hollyfield, J.E. (1981) The emergence, localization, and maturation of neurotransmitter systems during development of the retina in Xenopus laevis: II. Glycine, J. comp. neurol. 195, 585-593.

Recasens, M., Benezra, P., Basset, P. and Mandel (1980) Cysteine sulfinate aminotransferase and aspartate aminotrnsferase isoenzymes of rat brain. Purification, characterization, and further evidence for identity. Biochem. 19, 4583-4589.

Recasens, M. and Delannoy, J.P. (1981) Immunological properties and immunohistochemical localization of cysteine sulfinate or aspartate aminotransferase-isoenzymes in rat CNS. Brain Res. 205, 351-361.

Renaud, L.P., Martin, J.B. and Brazeau, P. (1975) Depressant action of TRH, LH-RH and somatostatin on activity of central neurones. Nature 255, 233-235.

Roberts, E. (1978) New directions in GABA research I: immunocytochemical studies of GABA neurons. In: GABA Neurotransmitters, Alfred Benzon Symposium 12, Munksgaard, pp. 28-45.

Saito, H. (1981) The effects of strychnine and bicuculline on the responses of X- and Y-cells of the isolated eye-cup preparation of the cat. Brain Res. 212, 243-248.

Salmoiraghi, G.C. and Weight, F. (1967) Micromethods in neuropharmacology: an approach to the study of anesthetics. Anesthesiol. 28, 54-64.

Schaeffer, J.M., Brownstein, M.J. and Axelrod, J. (1977) Thyrotropin-releasing hormone-like material in the rat retina: Changes due to environmental lighting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3579-3581.

Schiller, P.H. (1982) Central connections of the retinal ON and OFF pathways. Nature 297, 580-583.

Shiells, R.A., Falk, G. and Naghshinek S. (1981) Action of glutamate and aspartate analogues on rod horizontal and bipolar cells. Nature 294, 592-594.

Slaughter, M.M. and Miller, R.F. (1981) 2-Amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. Science 211, 182-185.

Steinberg, R.H., Reid, M. and Lacy, P.L. (1973) The distribution of rods and cones in the retina of the cat (Felis domesticus).

Sterling, P. (1983) Microcircuitry of the cat retina. Ann. Rev. Neurosci. 6, 149-185.

Stone, J. and Fukuda, Y. (1974) Properties of cat retinal ganglion cells: A comparison of W-cells with X- and Y-cells. J. Neurophysiol. 37, 722-748.

Stone, J. and Hoffmann, K.-P. (1971) Conduction velocity as a parameter in the organisation of the afferent relay in the cat's lateral geniculate nucleus. Brain Res. 32, 454-459.

Straschill, M. (1968) Actions of drugs on single neurons in the cat's retina. Vision Res. 8, 35-47.

Thier, P. and Wässle, H. (1983) Indolamine-mediated reciprocal modulation of ON- and OFF-centre ganglion cell activity in the retina of the cat. J. Physiol. (in press)

Voaden, M.J. (1979) Vision: the biochemistry of the retina. In: A.T. Bull, J.R. Lagnado, J.O. Thomas, and K.F. Tipton (eds): Companion to Biochemistry, Vol. 2. London and New York: Long man, pp. 451-473.

Wässle, H., Levick, W.R. und Cleland, B.G. (1975) The distribution of the alpha type of ganglion cells in the cat's retina. J. comp. Neurol. 159, 419-438.

Wässle, H. and Riemann, H.J. (1978) The mosaic of nerve cells in the mammalian retina. proc. R. Soc. Lond. B. 200, 441-461.

Watkins, J.C. and Evans, R.H. (1981) Excitatory amino acid transmitters. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21, 165-204.

Wong-Riley, M. (1979) changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. Brain res. 171, 11-28.

Wong-Riley, M. and Riley, D.A. (1983) The effect of impulse blockage on cytochrome oxidase activity in the cat visual system. Brain Res. 261, 185-193.

6. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Heinz Wässle (Frankfurt) für die ausgezeichnete Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken. Er hat aus einem trockenen Biokybernetiker einen nassen Neurobiologen gemacht. Deszö Varju (Tübingen) danke ich für moralische Unterstützung, für Knoblauchbrote und für die Begutachtung der Arbeit. Nick Brecha (Los Angeles) hat mich in die Immunohistochemie, die Autoradiographie und den Sunset Strip eingeführt. Brian Boycott (London) hat mir dann gesagt, was ich in Californien gemacht habe. David Vaney (Cambridge) hat mir die Kaninchenretina gezeigt - the poor man's brain - und damit auf kommende Aufgaben vorbereitet. Die Kollegen aus der Gravenbrucher WG ließen meinen Aufenthalt in Frankfurt zu einer guten Zeit werden. Mit Leo Peichl (Frankfurt) habe ich Glück und Leid der Neurotoxinforschung geteilt und mit Peter Thier (Tübingen) einen Trip in die Neuropeptide gestartet, bei dem die (heile?) Landung noch aussteht. Diese Arbeit wäre ohne die Mitarbeiter an der Frankfurter Hirnforschung nie zustande gekommen. Mein besonderer Dank geht an Doris Sausen und Felicitas Boij für die Hilfe bei allen Versuchen und für die Unzahl von Zeichnungen, die von ihnen angefertigt worden sind. Last not least mein Dank an Irmgard Odenthal, die alle Sekretariatsarbeiten schnell und sorfältig ausführte und insbesondere die vorliegende Arbeit in Rekordzeit getippt hat.

Lebenslauf

Name	: Jürgen Bolz
geboren	: 11.11.1952 in Urach
Eltern	: Reinhold Bolz und Elisabeth Bolz, geb. Künstner
Grundschule	: 1960 - 1964 in Urach
Gymnasium	: 1964 - 1972 Graf Eberhard Gymnasium Urach. Abitur Juni 1972
Studium	: ab Wintersemester 72/73 Studium der Biologie und Mathematik an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen Diplomarbeit bei Prof. Dr. D. Varju am Lehrstuhl für Biokybernetik, Universität Tübingen, März 1979 Diplom in Biologie
Zivildienst	: Mai 1979 - August 1980 Zivildienst im Psychophysiologischen Labor der Universitäts-Nervenklinik Tübingen bei Prof. Dr. H. Heimann.

Promotion : September 1980 Arbeit an einer Dissertation mit dem Thema "Neuropharmakologische Untersuchungen an der Säugerretina" bei Prof. Dr. H. Wässle am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen
Seit September 1981 wiss. Assistent am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt.
August 1982 - November 1982 Forschungsaufenthalt an der University of California in Los Angeles.

Meine akademischen Lehrer waren:

V. Braitenberg, E. Bünning, D. Gradmann, K.G. Grell,
K.P. Hadeler, H. Heimann, K. Kirschfeld, F.P. Möhres,
G. Möllenstedt, T. Poggio, W. Reichardt, D. Varju,
H. Wässle

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45